



Proteinkomponenten und Transportwege an der apikalen Membran polarer Epithelzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christoph Greb
aus Lauterbach

Marburg/Lahn 2011

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ralf Jacob

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I. ABBILDUNGS – UND TABELLENVERZEICHNIS

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	PROTEINTRANSPORT IN POLAREN EPITHELZELLEN	1
1.1.1	<i>Lipid-Raft-abhängiger apikaler Transportweg</i>	<i>5</i>
1.1.2	<i>Lipid-Raft-unabhängiger apikaler Transportweg</i>	<i>6</i>
1.2	ZENTRALE PROTEINE DIESER ARBEIT	8
1.2.1	<i>Galectin-3</i>	<i>8</i>
1.2.2	<i>Die unkonventionelle Sekretion von Galectin-3.....</i>	<i>9</i>
1.2.3	<i>Galectin-3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen</i>	<i>11</i>
1.2.4	<i>P75 – Neurotrophinrezeptor.....</i>	<i>12</i>
1.2.5	<i>Mx1 und die Dynamin-Superfamilie</i>	<i>13</i>
1.2.6	<i>Alphakinase-1 (ALPK1)</i>	<i>15</i>
1.3	DAS ENDOMEMBRANSYSTEM	16
1.3.1	<i>Vesikulärer Transport</i>	<i>16</i>
1.3.2	<i>Endozytose</i>	<i>17</i>
1.3.3	<i>Endosomale Kompartimente.....</i>	<i>18</i>
1.4	FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	ZELLKULTUR.....	22
2.1.1	<i>Kultivierung diverser Zelllinien</i>	<i>22</i>
	<i>Das MDCK-Zell-Modell.....</i>	<i>23</i>
2.1.2	<i>Passagieren von Zellen</i>	<i>23</i>
2.1.3	<i>Einfrieren/Auftauen von Zellen</i>	<i>24</i>
2.1.4	<i>Transfektion von MDCK-Zellen (Lipofektion).....</i>	<i>24</i>
2.1.5	<i>RNA-Interferenz (siRNA)</i>	<i>25</i>
2.2	ALLGEMEINE BIOCHEMISCHE METHODEN	28
2.2.1	<i>SDS-PAGE.....</i>	<i>28</i>
2.2.2	<i>Western-Blot</i>	<i>29</i>
2.2.3	<i>TCA-Fällung</i>	<i>30</i>
2.3	CO-IMMUNOPRÄZIPITATION	31
2.4	OBERFLÄCHEN-IMMUNOPRÄZIPITATION	32
2.5	MEMBRANAUFREINIGUNG.....	34
2.6	TGN-EXIT-EXPERIMENTE	36
2.7	VESIKEL-IMMUNOPRÄZIPITATION.....	37
2.8	2D-GELELEKTROPHORESE	39
2.8.1	<i>Erste Dimension: Die isoelektrische Fokussierung</i>	<i>39</i>
2.8.2	<i>Zweite Dimension: Das SDS-Gradientengel.....</i>	<i>40</i>
2.9	COOMASSIE-FÄRBUNG	43
2.10	SILBER-FÄRBUNG.....	43
2.11	MASSENSPEKTROMETRIE: MALDI-TOF	45
2.11.1	<i>Entfärbung</i>	<i>46</i>
2.11.2	<i>Trypsin-Behandlung („In-Gel-Verdau“)</i>	<i>47</i>

2.11.3	Auftrag auf das MALDI-Target.....	47
2.11.4	MALDI-TOF Massenspektrometer.....	48
2.12	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	49
2.12.1	MDCK-Zellen.....	49
2.12.2	Mäusedarm-Gewebeschnitte.....	50
2.13	MIKROSKOPIE	52
2.13.1	Total Internal Reflection Fluorescence-Mikroskopie (TIRFM)	52
2.13.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (KLSM)	53
2.13.3	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	54
2.14	SUB-KLONIERUNG Mx1-GFP	54
2.15	GALECTIN-3-SEKRETION	55
2.16	AUFNAHME VON REKOMBINANTEM GALECTIN-3 AUS DEM APIKALEN MEDIUM.....	55
2.16.1	TIRF-Analyse.....	55
2.16.2	Western-Blot-Analyse	56
2.17	METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON GALECTIN-3 IN HUMANEN KLARZELLIGEN NIERENZELLKARZINOMEN	57
2.17.1	Messung der Galectin-3-Expression in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen	57
2.17.2	Co-Immunpräzipitation von Galectin-3 in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen	57
2.18	CHEMIKALIEN UND GERÄTE	58
3	ERGEBNISSE	60
3.1	TRAFFICKING APIKALER MARKERPROTEINE IN ALPK1-KNOCKOUT-MÄUSEN	60
3.2	IDENTIFIKATION VON PROTEINEN IN P75-GFP-VESIKELN NACH TGN-EXIT	64
3.2.1	Aufreinigung von P75-GFP-Vesikeln	64
3.2.2	2D-Gelelektrophorese von P75-GFP-Vesikeln nach TGN-Exit	66
3.3	MX1 IST BESTANDTEIL NICHT MIT LIPID-RAFTS ASSOZIIERTER APIKALER TRANSPORTVESIKEL	70
3.4	ERSTELLEN EINER STABILEN MDCK _{Mx1-GFP} -ZELLINIE	72
3.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON MX1 IM APIKALEN PROTEINTRANSPORT.....	75
3.5.1	Mx1-GFP zeigt ein dynamisches Fissions- und Fusionsverhalten von Membranstrukturen	75
3.5.2	Colokalisation von P75-DsRed und Mx1-GFP	76
3.5.3	Mx1-GFP und diverse zelluläre Marker	78
3.5.4	Lokalisation von Mx1 in einem frühen endosomalen Kompartiment.....	80
3.6	EINFLUSS VON MX1 AUF DEN APIKALEN TRANSPORT VON P75	84
3.7	MX1-GFP UND GALECTIN-3 BEFINDEN SICH GEMEINSAM IN EINEM KOMPARTIMENT IM APIKALEN ZELLCORTEX.....	87
3.8	EINFLUSS VON MX1 AUF DIE UNKONVENTIONELLE SEKRETION VON GALECTIN-3	89
3.9	UNTERSUCHUNG DER SEKRETION VON GALECTIN-3 IM APIKALEN TIRFM	90
3.10	AUFNAHME VON GALECTIN-3 AUS DEM APIKALEN MEDIUM.....	97
3.10.1	Blockierung der Endozytose von Galectin-3 durch verschiedene Endozytosehemmer.....	97
3.10.2	Beobachtungen zur Aufnahme von Galectin-3-Alexa633 im apikalen TIRFM.....	98
3.11	TRANSPORTPROZESSE IM PRIMÄRZILIUM	102
3.12	GALECTIN-3 IN HUMANEN KLARZELLIGEN NIERENZELLKARZINOMEN	105
3.12.1	Untersuchung der Galectin-3-Expression in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen	105
3.12.2	Co-Immunopräzipitation von Galectin-3 in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen	107
4	DISKUSSION	108
4.1	TRAFFICKING APIKALER MARKERPROTEINE IN ALPK1-KNOCKOUT-MÄUSEN	108
4.2	GALECTIN-3 UND DER LIPID-RAFT-UNABHÄNGIGE APIKALE PROTEINTRANSPORTWEG	111
4.2.1	Entdeckung von Mx1 im Lipid-Raft-unabhängigen Proteintransportweg	111
4.2.2	Galectin-3-Recycling	115
4.3	GALECTIN-3 UND DIE ENTSTEHUNG KLARZELLIGER NIERENZELLKARZINOME	121
5	ZUSAMMENFASSUNG	125

6	LITERATURVERZEICHNIS.....	128
7	ANHANG	137
7.1	LEBENSlauf UND PUBLIKATIONEN	137
7.2	DANKSAGUNG.....	139
7.3	ERKLÄRUNG.....	141

I. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: Proteintransport in polaren Epithelzellen	3
Abbildung 1.2: Modell zur Sortierung Lipid-Raft-abhängiger und Lipid-Raft-unabhängiger apikaler Proteine	7
Abbildung 1.3: Die Galectin-Familie	9
Abbildung 1.4: Unkonventionelle Sekretion	11
Abbildung 1.5: Domänenstruktur der humanen Dynamin-Superfamilie	14
Abbildung 1.6: Vesikulärer Transport	17
Abbildung 1.7: Endozytosemechanismen	18
Abbildung 1.8: Endosomale Kompartimente am apikalen Zellpol und ihre Markerproteine	19
Abbildung 1.9: Das subapikale tubuläre Netzwerk im proximalen Tubulus	20
Abbildung 2.1: Kultivierung von MDCK-Zellen auf PET-Filtern	23
Abbildung 2.2: Funktionsmechanismen von siRNA	26
Abbildung 2.3: Prinzip der MALDI-TOF Massenspektrometrie	46
Abbildung 2.4: Prinzip der TIRF-Mikroskopie	52
Abbildung 2.5: Expressionsvektor Mx1-pEGFP-C2	54
Abbildung 3.1: Verteilung apikaler Markerproteine in ALPK1-Knockout-Mäusen	61
Abbildung 3.2: Die Verteilung von E-Cadherin in ALPK1-Knockout-Mäusen	62
Abbildung 3.3: Quantifizierung des Proteintransports in den Bürstensaum der ALPK1-Knockout-Mäuse	63
Abbildung 3.4: Aufreinigung von P75-GFP-Vesikeln	65
Abbildung 3.5: 2D-Gelelektrophorese von P75-GFP-Vesikeln nach TGN-Exit	67
Abbildung 3.6: Mx1 befindet sich in Vesikeln des apikalen nicht Lipid-Raft-Transportweges	71
Abbildung 3.7: Vergleich von endogenem Mx1 mit Mx1-GFP	73
Abbildung 3.8: Mx1-GFP	74
Abbildung 3.9: Fusion und Abspaltung von Mx1-GFP-tragenden Strukturen	76
Abbildung 3.10: Colokalisierung von Mx1-GFP und P75-DsRed im KLSM	77
Abbildung 3.11: Co-Immunopräzipitation von Mx1 und P75	77
Abbildung 3.12: KLSM-Aufnahmen von Mx1-GFP und diversen zellulären Markern	79
Abbildung 3.13: Mx1 im Endozytoseweg	81
Abbildung 3.14: Co-Immunopräzipitation von Mx1 und Dynamin-2	82
Abbildung 3.15: Mx1-GFP und Endosomen im apikalen TIRF	83
Abbildung 3.16: Knock-Down von Mx1 in MDCK-Zellen	85
Abbildung 3.17: Oberflächen-Immunopräzipitation von P75-GFP nach Mx1-knock-down	86
Abbildung 3.18: Colokalisierung von Mx1-GFP und Galectin-3 im apikalen TIRFM	87
Abbildung 3.19: Co-Immunopräzipitation Mx1	88
Abbildung 3.20: Mx1 beeinflusst die unkonventionelle Sekretion von Galectin-3	89
Abbildung 3.21: Lokalisation von Galectin-3 am apikalen Zellpol	91
Abbildung 3.22: TEM von MDCK _{P75-GFP} -Zellen	92
Abbildung 3.23: Vergleich von Epifluoreszenz-, und TIRF-Mikroskopie	93
Abbildung 3.24: P75-GFP-Strukturen assoziieren mit dem Actin-Zytoskelett	94
Abbildung 3.25: P75-GFP und Galectin-3-DsRed befinden sich in einem subapikalen Kompartiment dicht unter der Zytoplasmamembran	96
Abbildung 3.26: Aufnahme von rekombinantem humanem Galectin-3 in MDCK-Zellen	98
Abbildung 3.27: Aufnahme von rekombinantem humanem Galectin-3 in MDCK-Zellen in der apikalen TIRF-Mikroskopie	100
Abbildung 3.28: Aufnahme von rekombinantem humanem Galectin-3 in MDCK-Zellen in der apikalen TIRF-Mikroskopie – Quantifizierung	101
Abbildung 3.29: 3D-Rekonstruktion von Mx1-GFP und Tubulin-A546	102

Abbildung 3.30: Zilienlänge im Verlauf der Polarisation	103
Abbildung 3.31: Vesikulärer Proteintransport im Primärzilium.....	104
Abbildung 3.32 Galectin-3 wird in klarzelligen Nierenzellkarzinomen überexprimiert und interagiert mit β -Catenin.....	105
Abbildung 3.33: Quantifizierung der Expressionslevel diverser Proteine in klarzelligen Nierenzellkarzinomen -	106
Abbildung 4.1: ALPK1 im Lipid-Raft-abhängigen apikalen Proteintransport.....	110
Abbildung 4.2: Modell zur Rolle von Galectin-3 und Mx1 in polaren Epithelzellen.....	124
 Tabelle 2.1: Zelllinien und verwendete Medien	22
Tabelle 2.2: Transfektions-Volumina.....	25
Tabelle 2.3: SDS-PAGE Zusammensetzung	28
Tabelle 2.4: Antikörper für Western-Blots	30
Tabelle 2.5: Antikörper für Oberflächen-Immunopräzipitation	33
Tabelle 2.6: Programm für die isoelektrische Fokussierung	40
Tabelle 2.7: 2D SDS-PAGE Zusammensetzung	41
Tabelle 2.8: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-Zellen	50
Tabelle 2.9: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung von Maudarmpräparaten	51
Tabelle 2.10: Chemikalien	58
Tabelle 2.11: Proteaseinhibitoren	59
Tabelle 2.12: Geräte und Zellkulturmaterial	59
Tabelle 3.1: In P75-GFP-Vesikeln identifizierte Proteine	69

II. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat	M	molar (mol/L)
ARE	Apikales Recycling-Endosom	min	Minuten
AS	Aminosäure	MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
GTP	Guanosintriphosphat	N-Terminus	Aminoterminus
GDP	Guanosindiphosphat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
BRE	Basolaterales Recycling-Endosom	PAS	Protein-A-Sepharose
C-Terminus	Carboxyterminus	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Da	Dalton	PBS⁺⁺	PBS mit je 1 mM MgCl ₂ und CaCl ₂
dH₂O	demineralisiertes Wasser	PDA	Piperazin-Di-Acrylamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PEG	Polyethylenglycol
DRM	Detergens resistente Membran	PGC	<i>Post-Golgi-Kompartiment</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DsRed	<i>Red Fluorescent Protein</i>	SAV	SI assoziiertes Vesikel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
EtOH	Ethanol	TCA	Trichloressigsäure
FKS	fötales Kälberserum	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung	TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Gal	Galaktose	TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
Glu	Glukose	ü. N.	über Nacht
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol	v/v	Volumen pro Volumen
HA	Hämagglutinin	w/v	Gewicht pro Volumen
His	Hexahistidin	YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
λ	Wellenlänge		
KLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop		
LAV	LPH assoziiertes Vesikel		

1 Einleitung

1.1 Proteintransport in polaren Epithelzellen

Zellen stellen den kleinsten Baustein im Aufbau eines **Organismus** dar. Dabei lässt sich dieser zunächst weiter in **Organe** und darin enthaltene **Gewebe** differenzieren. Als ein Gewebe bezeichnet man einen Zusammenschluss von Zellen gleicher oder ähnlicher Funktion. Ein Beispiel für solch ein Gewebe stellen **Epithelien** dar, welche die Aufgabe besitzen, das Innere eines Organes von der Außenwelt abzuschirmen. Epithelien stellen also die Oberfläche eines Organes dar, was sehr spezifische Ansprüche an die darin enthaltenen Zellen stellt. So befindet sich ein Teil der Zelloberfläche in einem anderen Milieu als der andere. Am Beispiel des Magenwandepithels wird deutlich, wie groß diese Unterschiede etwa in Bezug auf den umgebenden pH-Wert sein können. Während die eine Seite der Epithelzellen dem extrem sauren Magenumen ausgesetzt ist, grenzt der andere Teil an ein pH-neutrales Milieu. Dieser Unterschied in den Anforderungen an die Epithelzelle spiegelt sich in der Lipid- und Proteinzusammensetzung ihrer beiden sogenannten Membrandomänen wider. Man unterscheidet hier zwischen einer **apikalen** und einer **basolateralen** Zytoplasmamembran-Untereinheit. Dabei ist die apikale Zytoplasmamembran immer der Außenwelt zugewandt, während die basolaterale Zytoplasmamembran zum Inneren des Organs zeigt. Beide Membranabschnitte werden von Tight Junctions voneinander abgegrenzt. Die Diskrepanz dieser Zellen hinsichtlich ihres ungleichen Zytoplasmamembranaufbaus führte dazu, von **polaren Epithelzellen** zu sprechen. Um deren Polarität aufrecht zu erhalten, bedarf es eines geregelten und gezielten Protein- und Lipidtransports in die jeweilige Zytoplasmamembrandomäne. Dies wird von einem einzigartigen Proteinsortier- und Transportsystem gewährleistet.

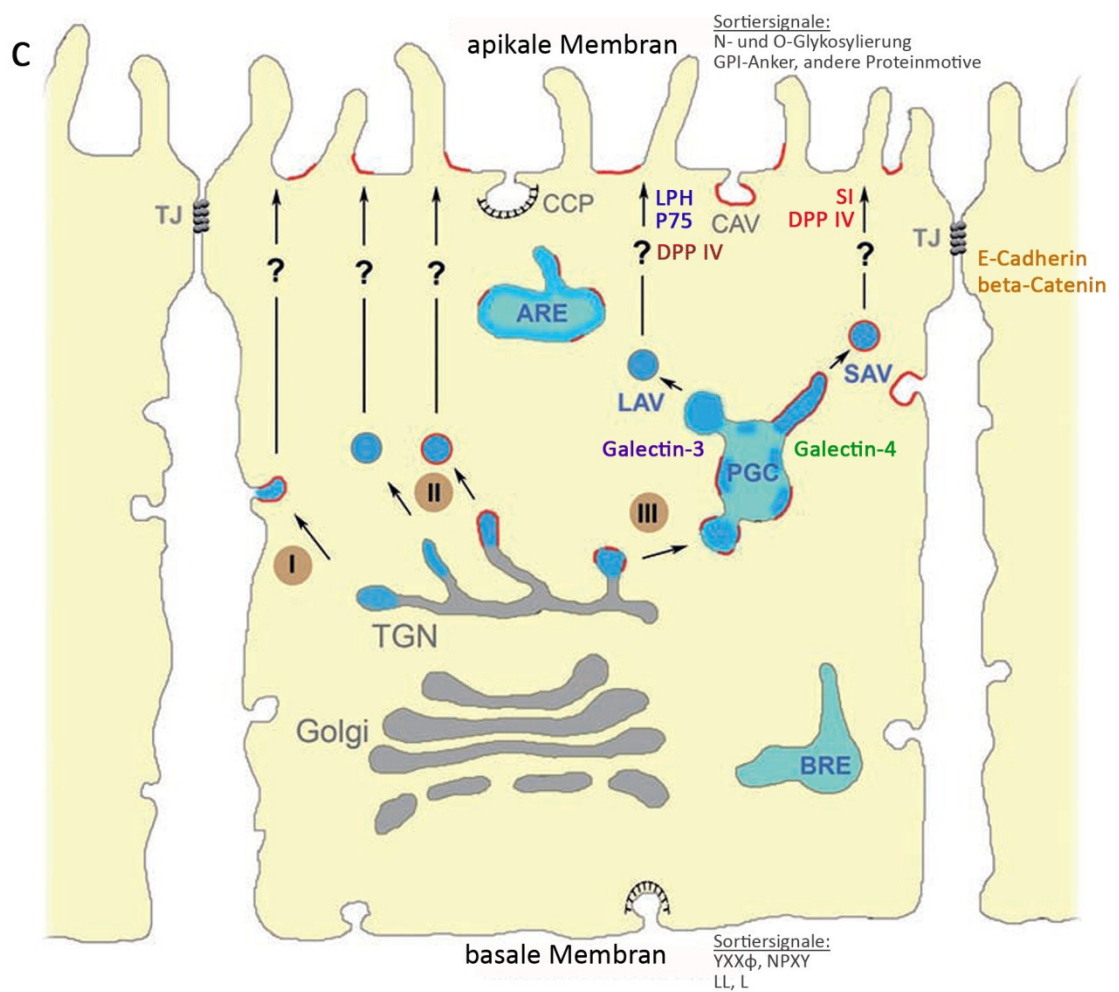
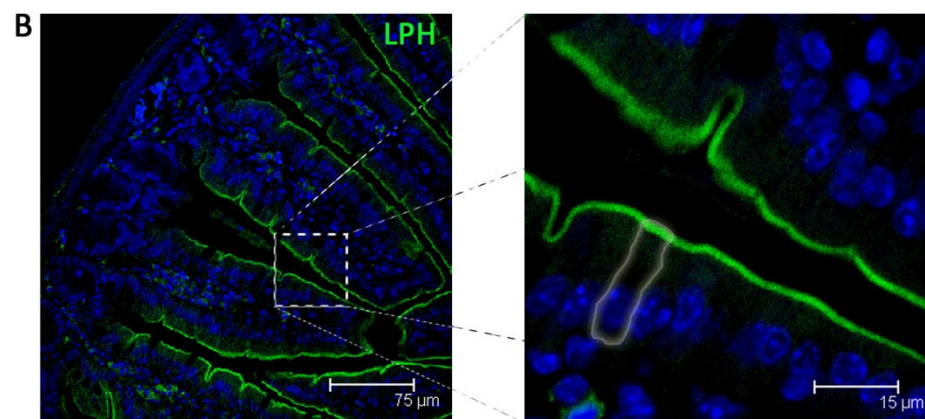
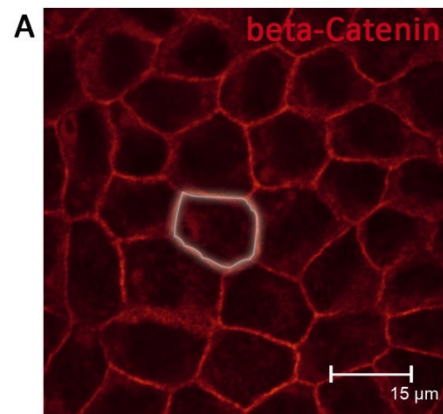
In der vorliegenden Arbeit wurden aus der Hundeniere stammende **MDCK II-Zellen** (Madin Darby Canine Kidney) als eine Modellzelllinie zur Erforschung des polaren Proteintransports in Epithelzellen verwendet (**Abb. 1.1 A**). Diese können auf diversen Oberflächen wie Kunststoff oder Glas ausgebracht werden und bilden dann mit der Zeit ein Zell-Monolayer (MADIN et al., 1957). In diesem sind alle Zellen mit ihrem basalen Teil zum Substrat orientiert, während ihr apikaler Teil in das Flüssigmedium ragt. Als weiteres Studienobjekt dienten histologische Schnitte aus dem Dünndarm der Maus. Auch hier trifft man auf ein klassisches Epithel (**Abb. 1.1 B**). In diesen Zellen werden Verdauungsenzyme wie die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) oder die Saccharase-Isomaltase (SI) in den Bürstensaum – also die apikale Zytoplasmamembrandomäne – transportiert, um im Darmlumen die entsprechenden Kohlenhydrate zu prozessieren. Beiden Zelltypen liegt ein gemeinsames Proteinsortiersystem zur Aufrechterhaltung ihrer Polarität zu Grunde, auf das in den folgenden

Abschnitten näher eingegangen werden wird. Zusammenfassend könnte man sagen, dass man zunächst einen basolateralen Proteintransport von einem apikalen Proteintransport unterscheiden kann (**Abb. 1.1 C**). In welche der beiden Membrandomänen ein Protein transportiert wird, hängt von **topogenen Signalen** ab, die in der Struktur oder der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins codiert sind (Mellman and Nelson, 2008; Weisz and Rodriguez-Boulán, 2009). Im Fall des basolateralen Proteintransports sind dies Di-Leucin (LL) und Tyrosin-Motive (YXX ϕ , NPXY), die oft in der Nähe saurer Aminosäuren zu finden sind (Hunziker et al., 1991; Matter et al., 1992). Diese Aminosäuremotive liegen meist im zytoplasmatischen Teil des Proteins. So werden z. B. bereits im **Trans-Golgi-Netzwerk** (TGN) basolaterale Proteine durch einen Clathrin-abhängigen Transportmechanismus von apikalen Proteinen getrennt (Deborde et al., 2008; Traub, 2005). Dort spielt das Adapterprotein AP1A vermutlich eine Rolle (Gonzalez and Rodriguez-Boulán, 2009; Gravotta et al., 2007). Als Ort der Proteinsortierung können aber auch andere Kompartimente in Erscheinung treten. So finden Sortierprozesse auch in einer Vielzahl diverser Endosomen statt. Allen voran die **Recycling-Endosomen**. Hier existieren laut dem derzeitigen Stand der Kenntnis sowohl apikale (ARE), als auch basolaterale (BRE) Varianten. Oft wird auch noch ein gemeinsames Recycling-Endosom (CRE) beschrieben. In diesen Kompartimenten finden hauptsächlich Sortierprozesse endozytierter Proteine statt, die durch die Erkennung ihrer jeweiligen topogenen Signale wieder in die korrekte Membrandomäne auf der Zelloberfläche transportiert werden. Allerdings existieren auch vorwärtsgerichtete Transportwege, die Endosomen passieren. So konnten Cramm-Behrens *et al.* zeigen, dass die beiden apikalen Proteine LPH und SI auf ihrem Weg zur Zytoplasmamembran sukzessive ein Rab4-, ein Rab8-, und ein Rab11-tragendes endosomales Kompartiment durchlaufen (Cramm-Behrens et al., 2008).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit fokussieren sich auf die Untersuchung des apikalen Transportweges. Dieser lässt sich wiederum in mehrere Routen gliedern, welche in **Abb. 1.1 C** wiedergegeben und mit römischen Ziffern gekennzeichnet werden. Als bisher bekannte apikale Erkennungssignale dienen **N- und O-Glykosylierungen** oder ein **Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker** (GPI-Anker) (Vagin et al., 2009). Diese beiden Signale lassen es zu, den apikalen Proteintransport in zwei weitere Routen zu differenzieren, auf die in den Abschnitten 1.1.1 und 1.1.2 näher eingegangen werden wird. Hier wird nochmals zwischen einem Lipid-Raft-abhängigen und einem Lipid-Raft-unabhängigen Weg unterschieden (Jacob et al., 2003). Des Weiteren sollte die Möglichkeit der Transzytose erwähnt werden (I). Einige Proteine gelangen, bevor sie ihren apikalen Bestimmungsort erreichen, zunächst in die basolaterale Membran, von wo aus sie schließlich durch Endozytose wieder aufgenommen und in die korrekte Zytoplasmamembrandomäne sortiert werden (Brandli et al., 1990; Chmelar and Nathanson, 2006; Gibson et al., 1998).

Abbildung 1.1: Proteintransport in polaren Epithelzellen

Polare Epithelzellen bilden eine Barriere zwischen einem Organ und der Außenwelt. A) MDCK-Zellen sind solche polaren Epithelzellen aus der Hundeniere. Anhand des basolateralen Markers β -Catenin werden die Zellgrenzen sichtbar. Der helle Ring markiert eine dieser Zellen in der Aufsicht, die schematisch in Abb. C im Querschnitt wiedergegeben wird. B) Ein weiterer Typ von polaren Epithelzellen kommt im Darm vor. In diesem Fall sind die Darmzotten einer Maus abgebildet, in denen das Enzym Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) mittels Antikörper angefärbt wurde. In der Vergrößerung werden die einzelnen Zellen sichtbar (helle Umrandung) und es wird deutlich, dass die LPH dort ausschließlich in die apikale Membran – den sog. Bürstensaum – transportiert wird. C) Hier wird das spezielle Proteinsortierungs- und Transportsystem von polaren Epithelzellen abgebildet. Für die Aufrechterhaltung der Polarität müssen apikale oder basolaterale Proteine in die jeweils richtige Zytoplasmamembran-Domäne geleitet werden. Dies geschieht anhand diverser Sortiersignale. Basolaterale Proteine werden beispielsweise aufgrund von Aminosäuren-basierenden Signalen (Lysin-reichen zytosolischen Signalen) im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) aussortiert und u.a. über Clathrin-ummantelte Vesikel zur basolateralen Zytoplasmamembran transportiert (I). Im apikalen Transportweg bestehen mehrere Möglichkeiten. Zum einen können apikale Proteine den direkten Weg vom TGN über vesikuläre Strukturen zur apikalen Zytoplasmamembran nehmen (II). Zum anderen existiert ein Weg über ein *Post-Golgi-Kompartiment* (PGC), in welchem sich Lipid-Raft-assoziierte von nicht mit Lipid-Rafts assoziierten apikalen Proteinen voneinander trennen (III). Apikale Sortiersignale basieren meist auf der Glykosylierung der Proteine (P75, LPH) oder deren Assoziation mit Lipid-Rafts (SI), z. B. durch einen GPI-Anker. Ein weiterer Weg führt durch Transzytose über die basolaterale Membrandomäne (I). Diverse Endosomen (ARE, BRE) können sowohl im endozytotischen als auch im vorwärtsgerichteten Proteinsorting involviert sein und dienen neben dem TGN als weitere Sortierstation. Lipid-Rafts sind als rote Membranabschnitte dargestellt ARE: apikales Recycling-Endosom, BRE: basolaterales Recycling-Endosom, CAV: Caveolae, CCP: Clathrin coated pit, DPP IV: Dipeptidyl Peptidase IV, LAV: LPH assoziierte Vesikel, LPH: Lactase-Phlorizin-Hydrolase, SAV: SI assoziierte Vesikel, SI: Saccharase-Isomaltase, TJ: Tight Junction, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk (Abb. C abgeändert nach (Delacour and Jacob, 2006))



1.1.1 Lipid-Raft-abhängiger apikaler Transportweg

Biologische Membranen sind in ihrem Aufbau nicht homogen, sondern lassen sich hinsichtlich ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung in verschiedene Domänen einteilen. Besonders Cholesterolreiche Bereiche, die außerdem häufig eine erhöhte Sphingolipid-Konzentration aufweisen, besitzen spezielle Eigenschaften und sind in gewissen Detergensen wie dem nichtionischen Triton X-100 (bei 4°C) unlöslich. Diese **Detergens resistenten Membranen** (DRMs) werden auch **Lipid-Rafts** genannt (van Meer G. et al., 1987; van and Sprong, 2004), da sie Mikrodomänen innerhalb einer Biomembran darstellen, die einem Boot ähnelnd in dieser „umher schwimmen“. Lipid-Rafts gelten als Zentren der Signaltransduktion, da sie u. a. Kinasen der src-Familie beherbergen (Simons and Ikonen, 1997). Diese assoziieren aufgrund ihrer doppelten Acylierung mit den Membranmikrodomänen. Weitere Strukturen, die zu einer präferentiellen Lipid-Raft-Assoziation führen sind **GPI-Anker**. Typisches Beispiel hierfür ist z. B. die Plazenta alkalische Phosphatase (PLAP). Lipid-Rafts im klassischen Sinne sind im Endoplasmatischen Reticulum nicht vorzufinden, sondern werden erst im Golgi-Apparat assembliert, wo auch GPI-verankerte Proteine in diese Cholesterol-reichen Mikrodomänen Einlass erhalten. Eine weitere Gruppe von Proteinen, die in Lipid-Rafts vorzufinden sind, sind Transmembranproteine wie die **Saccharase-Isomaltase** (SI) (Jacob et al., 2000) oder die Influenzaproteine Hämagglutinin (HA) oder Neuraminidase (NA). Von Letzterer ist bekannt, dass ein bestimmter Transmembranbereich für die Assoziation mit DRMs und den Transport zur apikalen Zytoplasmamembran sorgt (Kundu et al., 1996). Zur Entstehung eines Lipid-Raft basierten Protein-Sortiermechanismus lieferten Schuck *et al.* ein Modell, in dem beschrieben wird, dass Lipid-Raft-assoziierte Proteine selbst für die Assemblierung der DRMs zuständig sind (Schuck and Simons, 2004). Diese Proteine könnten auf der zytoplasmatischen Seite z. B. von einem Annexin-ähnlichen Protein vernetzt werden, während dies auf der luminalen Seite von einem Lectin übernommen würde. Beides könnte zu einem Zusammenlagern der Lipid-Raft-assoziierten Proteine führen (*Clustering*) und *per se* eine Membrankrümmung hervorrufen, die letztlich im Abschnüren eines Transportvesikels enden würde. Tatsächlich wurde das an Sulfatide (Hydrosulfatester von Glykosphingolipiden) bindende **Galectin-4** als Komponente des apikalen Lipid-Raft-basierenden Proteintransports bereits identifiziert (Delacour et al., 2005) (**Abb. 1.1 C**). Paladino *et al.* beschreiben, dass ein GPI-Anker alleine kein ausreichendes Signal für einen apikalen Transport ist, sondern dass erst die Clusterbildung der GPI-Proteine zu deren apikalen Transport führte. In Dichtegradienten konnte gezeigt werden, dass basolaterale GPI-Proteine nicht in oligomerer Form vorzufinden waren (Paladino et al., 2006; Paladino et al., 2004). Lipid-Rafts stellen also eine Proteinsortier-Plattform dar, in der sich Proteine mit bestimmten Motiven wie GPI-Ankern sammeln. Jedoch erst der

Zusammenschluss dieser Proteine zu hochmolekularen Komplexen führt zu deren apikaler Sortierung.

1.1.2 Lipid-Raft-unabhängiger apikaler Transportweg

Die Assemblierung und Clusterbildung in Lipid-Rafts ist nicht der einzige apikale Proteinsortiermechanismus. Viele apikale Proteine befinden sich außerhalb dieser Membranamikrodomänen. Beispiele hierfür sind die **Lactase-Phlorizin-Hydrolase** (LPH), Endolyn oder der Neurotrophinrezeptor **P75**. Bei P75 liegt das topogene Signal für die Sortierung in die apikale Zytoplasmamembran in der **Glykosylierung** verschiedener Aminosäuren (Breuza et al., 2002). Als essentieller Sortierrezeptor dient in diesem Fall das Lectin **Galectin-3**, auf welches in Abschnitt 1.2.1 noch näher eingegangen werden wird. Lektine sind Kohlenhydrat bindende Proteine deren Präferenzen für unterschiedliche Glykane in der *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD) begründet liegen. Im Fall von Galectin-3 bindet diese vorzugsweise an β -Galactoside (Massa et al., 1993), wie sie in den O-Glykosylketten der Stab-Domäne von P75 anzutreffen sind. Unterdrückt man die Expression von Galectin-3 in MDCK-Zellen, so werden die Glykoproteine P75, LPH und GP114 nicht mehr in die apikale Zytoplasmamembran transportiert. Auf die korrekte Sortierung Lipid-Raft assoziierter Proteine wie SI hat dies keinen Effekt (Delacour et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass für die korrekte Sortierung von P75 und GP114 ein dem im Lipid-Raft-abhängigen Proteinsortiermechanismus ähnliches Szenario zu tragen kommt, in dem die sortierten Proteine hochmolekulare Komplexe ausbilden (Delacour et al., 2007). In Analogie zum Lipid-Raft-Sortiermodell besteht die Möglichkeit der Quervernetzung apikaler Glykoproteine in einem Sortierkompartiment. Als Bindeglied dient in diesem Fall Galectin-3, welches mit seiner CRD an die Glykoproteine binden kann, während es mit seiner Multimerisierungsdomäne am N-Terminus mit weiteren Galectin-3-Molekülen in Kontakt tritt. Dies könnte zu einer Membrankrümmung führen, die letztlich im Abschnüren eines Vesikels endet, welches nur Glykoproteine aus Nicht-Lipid-Raft-Domänen beinhaltet. Dabei ist nicht geklärt, ob an diesem Prozess außerdem diverse Mantelproteine eine Rolle spielen könnten oder ob beim Abschnüren der Vesikel möglicherweise ein Dynamin-ähnliches Protein behilflich ist. Im basolateralen Transport ist dies wie bereits erwähnt der Fall. Hier spielen z. B. AP1A und Clathrin eine Rolle. Des Weiteren wurde bekannt, dass Dynamin-2 am Transport von P75 aus dem TGN beteiligt ist. Exprimiert man eine dominant negative Dynamin-2-Mutante, so entstehen tubuläre P75-Strukturen am Golgi-Apparat, die nicht wie normalerweise in Vesikel abgeschnürt werden (Kreitzer et al., 2000). Am Weitertransport von P75 zur Zytoplasmamembran sind die Tubulin-Motoren KIF5B und KIF5C beteiligt (Astasina and Jacob, 2010; Jaulin et al., 2007). Letzterer

ist der postulierte Motor, der am gemeinsamen Transport von Lipid-Raft- und Nicht-Lipid-Raft-Proteinen vom Golgi-Apparat in ein *Post-Golgi-Kompartiment* (**Abb. 1.1 C**) beteiligt sein soll, in dem weitere Sortierungen vorgenommen werden. Der Lipid-Raft-unabhängige apikale Proteinsortierweg stellt also eine Alternative zum Lipid-Raft-assoziierten Weg dar. In beiden Wegen spielt die Oligomerisierung der sortierten Proteine eine tragende Rolle im eigentlichen Sortierprozess. Während im einen Fall Galectin-4 dafür sorgt, Lipid-Raft-typische Glykosphingolipide mit Lipid-Raft-Glykoproteinen zu verbinden, sorgt Galectin-3 im alternativen Weg für die Schaffung einer Sortierplattform, indem es Nicht-Lipid-Raft-Glykoproteine mit sich selbst zu hochmolekularen Proteinclustern verbindet (**Abb. 1.2**).

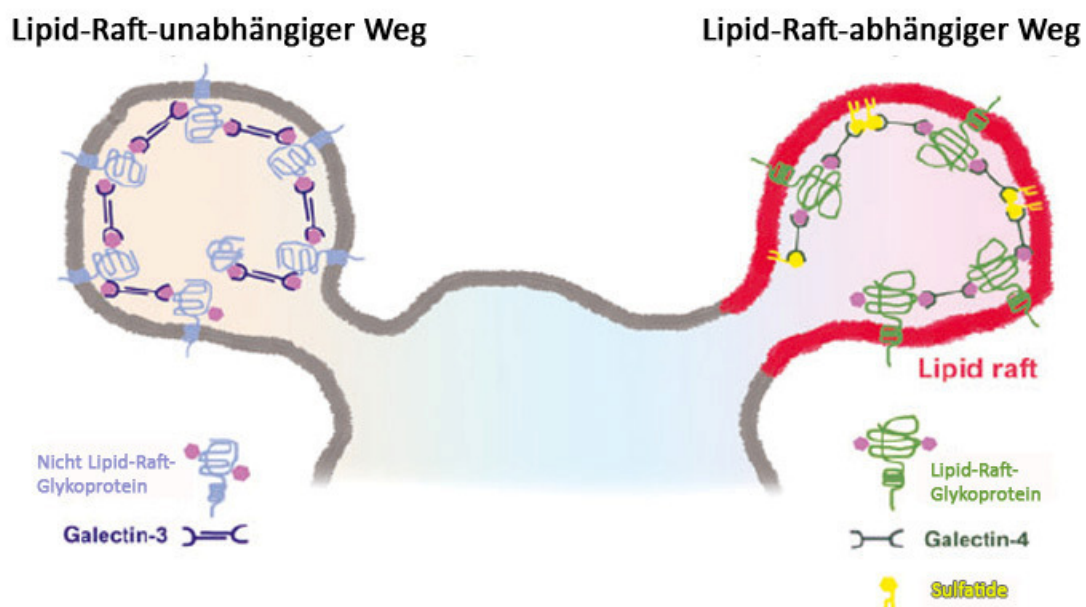


Abbildung 1.2: Modell zur Sortierung Lipid-Raft-abhängiger und Lipid-Raft-unabhängiger apikaler Proteine

In der Sortierung von apikalen Proteinen in Endosomen scheinen Kohlenhydrat bindende Proteine – Lektine – eine Rolle zu spielen. Im Lipid-Raft-abhängigen Sortierweg bindet Galectin-4 an Sulfatide (Glykosphingolipide) und stabilisiert somit Lipid-Rafts. Möglicherweise bindet es außerdem an Lipid-Raft-Glykoproteine und sorgt so für die Bildung hochmolekularer Cluster, welche die Voraussetzung für deren apikalen Transport sind. In Analogie dazu bindet Galectin-3 Nicht-Lipid-Raft-Glykoproteine. Durch Multimerisierung mit anderen Galectin-3-Molekülen werden auch hier hochmolekulare Cluster gebildet (abgeändert nach (Delacour et al., 2009)).

1.2 Zentrale Proteine dieser Arbeit

1.2.1 Galectin-3

Galectin-3 gehört zu der Familie der Lektine. Dies sind Proteine mit einer hohen Affinität für Kohlenhydrate, an welche sie mit Hilfe ihrer Kohlenhydrat-Bindedomäne (engl.: Carbohydrate Recognition Domain = **CRD**) binden können. Dies eröffnet die Möglichkeit, Glykolipide oder Glykoproteine miteinander zu vernetzen (**Abb. 1.3**). In Säugetieren existieren 15 bisher bekannte Galectine, wobei bis jetzt von zweien bekannt wurde, am apikalen Proteintransport beteiligt zu sein. Zunächst wurde Galectin-4 eine Rolle im Lipid-Raft-abhängigen Proteintransportweg zugesprochen (**Abb. 1.2**). Galectin-3 kristallisierte sich als essentieller Faktor im Sortieren der apikalen Nicht-Lipid-Raft-Proteine LPH, GP114 und P75 heraus. Der *knock-down* von Galectin-3 hatte den basolateralen Transport dieser Proteine zur Folge. Im Laufe der Untersuchungen wurde Galectin-3 im Lumen apikaler Transport-Vesikel nachgewiesen, die die nicht Lipid-Raft-assoziierten Proteine LPH, GP114 und P75 enthielten. In Vesikeln mit Lipid-Raft-assoziierten Proteinen wie der SI war Galectin-3 nicht anwesend. FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) konnte nur zwischen Galectin-3 und LPH gemessen werden, nicht zwischen Galectin-3 und SI. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 in die angesprochenen Vesikel 10 min nachdem diese aus dem TGN abknospen eintritt. In Co-Immunopräzipitations-Versuchen konnte eine Galactose-abhängige Interaktion zwischen Galectin-3 und LPH bzw. P75 bzw. GP114 festgestellt werden. Gal-3 wurde daraufhin als apikaler **Sortier-Rezeptor** postuliert (Delacour et al., 2006).

Galectin-3 (Hund: 30 kDa) besitzt eine C-terminale **Kohlenhydrat-Bindedomäne** (14 kDa), mit der es an Galactose-enhaltende Glykane binden kann. Außerdem kann es durch seine N-terminale **Oligomerisierungs-Domäne** (15 kDa) an andere Galectin-3-Moleküle binden. Die Bindung an Galactose geschieht über Wasserstoff-Brücken zwischen His-44, Asn-48 und Arg-48 von Galectin-3 mit dem O4-Atom des Monosaccharids, außerdem über Arg-29 und dem O3-Atom (Rini and Lobsanov, 1999). Unter diesen Voraussetzungen ist Galectin-3 in der Lage, hochmolekulare Proteinkomplexe, sog. *Cluster* zu bilden (Patnaik et al., 2006). Galectin-3 liegt sowohl intra- als auch extrazellulär vor. Eine Besonderheit liegt darin, dass es keine ER-Signalsequenz besitzt und bisher ungeklärt ist, wie es die Zelle verlässt. Die Sekretion von Galectin-3 geschieht in Epithelzellen nur in der apikalen Membran (Lindstedt et al., 1993). Galectin-3 ist in zahlreiche biologische Prozesse involviert. Funktionen in Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix-Adhäsion, Zellwachstum und Differenzierung, Zellzyklus, Signaltransduktion, Immunreaktion, Apoptose, Angiogenese und Tumorgenese wurden bereits publiziert (Dumic et al., 2006; Kang et al., 2009; Nieminen et al., 2005). Dabei wird es in manchen Geweben nur zeitweise exprimiert. Eine weitere Regulation der Galectin-3-Aktivität könnte über die Phosphorylierung geschehen (Balan et al., 2010). Diese hat einen Einfluss

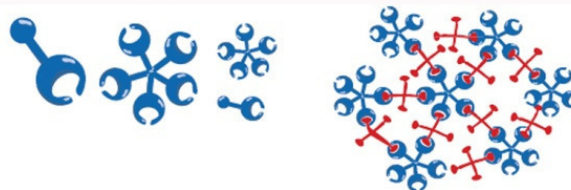
auf die Zuckerbindungs-Eigenschaften von Galectin-3 (Mazurek et al., 2000). Die N-terminale Oligomerisierungs-Domäne von Galectin-3 ist außerdem sehr Protease sensitiv und gibt den Weg für weitere Spekulationen bezüglich der Regulation seiner Aktivität frei (Massa et al., 1993). Die Oligomerisierung könnte z. B. von endogenen Proteasen gesteuert werden. Als Beispiel für eine Galectin-3 schneidende Protease wurde erst kürzlich z. B. von Puthenedam *et al.* über die Metalloprotease MMP7 berichtet (Puthenedam et al., 2011).

In MDCK-Zellen werden die Galectine 3, 9, 8, 1, 4 und 7 exprimiert (in absteigender Menge) (Poland et al., 2010).

A) Prototyp (Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15)



B) Chimärer Typ (Galectin-3)



C) Tandem-Repeat-Typ (Galectin-4, -6, -8, -9, -12)



Abbildung 1.3: Die Galectin-Familie

Galectine lassen sich in verschiedene Typen einteilen. A) Der Prototyp besitzt nur eine CRD. Prototyp-Galectine können untereinander Dimere ausbilden. B) Galectin-3 wird als chimärer Typ bezeichnet, da es neben der C-terminalen CRD eine N-terminale Multimerisierungsdomäne trägt, unter deren Mitwirkung es Pentamere ausbilden kann. C) Tandem-Repeat-Galectine besitzen zwei verschiedene CRDs, die über eine Linker-Region verbunden sind. Über ihre CRD können Galectine Netzwerke mit diversen Glykokonjugaten wie Glykolipiden oder Glykoproteinen aufbauen (abgeändert nach (Yang et al., 2008)).

1.2.2 Die unkonventionelle Sekretion von Galectin-3

Der klassische Sekretionsweg beginnt beim cotranslationalen Transport naszierender Proteine mit ER-Signalsequenz über die Membran des rauen Endoplasmatischen Reticulums (rER). Dort beginnt die N-Glykosylierung. Im Folgenden wandern sekretierte Proteine aus dem rER über einen COP II-

Vesikeltransport zum Golgi-Apparat, wo N-Glykane prozessiert werden und die O-Glykosylierung stattfindet. Nach Passage der cis-, medialen und trans-Golgi-Zisternen gelangen die Proteine in das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Dieses tubulo-vesikuläre Netzwerk ist eine potentielle Sortierstation, in der erste Proteinsortierschritte ausgeführt werden. So werden hier z. B. in polaren Epithelzellen basolaterale Proteine über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus separiert (Deborde et al., 2008). Andere Proteine werden über in Abschnitt 1.1 beschriebene Sortiervorgänge zur apikalen Zytoplasmamembran transportiert. Generell handelt es sich bei der klassischen Sekretion um einen Vesikel-basierten Transport zu der jeweiligen Zytoplasmamembrandomäne, wo sekretorische Vesikel mit dieser verschmelzen und der Inhalt der Vesikel in den extrazellulären Raum gelangt.

Von Galectin-3 ist bekannt, dass auch dieses aus der Zelle transportiert wird. Allerdings nicht über den klassischen sekretorischen Weg. Der Sortierrezeptor im apikalen Proteintransport besitzt keine ER-Signalsequenz, sondern wird zunächst im Zytoplasma synthetisiert. Von dort aus gelangt es u. a. in Vesikel mit apikalen Glykoproteinen, die fünf Minuten zuvor aus dem TGN entlassen wurden. Hier bildet es aufgrund seiner hohen Affinität zu β -Glykanen hochmolekulare Komplexe mit Nicht-Raft-Proteinen wie P75 und GP114. Ob und wann diese Verbindung wieder gelöst wird, ist bis dato nicht bekannt. Neben den in **Abb. 1.4** erwähnten Möglichkeiten der unkonventionellen Sekretion (Nickel, 2003) könnte der Huckepack-Transport von Galectin-3 mit apikalen nicht Lipid-Raft-assoziierten Glykoproteinen in den Extrazellulärraum eine weitere Sekretionsweise darstellen. Blockiert man den Transport von Proteinen aus dem TGN durch eine Temperaturänderung auf 20°C, so gelangt auch kein Galectin-3 aus der Zelle heraus, was einen weiteren Hinweis auf die enge Verknüpfung der Galectin-3-Sekretion mit dem klassischen Sekretionsweg gibt. Dabei sollte allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass genauso die Möglichkeit besteht, dass einer der unkonventionellen Sekretionswege ebenfalls bei 20°C gehemmt wird. Betrachtet man die Möglichkeiten der unkonventionellen Sekretion, die in **Abb. 1.4** beschrieben werden, so wurde Galectin-3 bereits auf zwei dieser Wege untersucht. Das Blockieren apikaler ABC-Transporter mit Verapamil hatte keinen Einfluss auf die Galectin-3-Sekretion (Horio et al., 1989; Lindstedt et al., 1993). Folglich können die Wege 1 und 2 im Schema aus **Abb. 1.4** für Galectin-3 eher ausgeschlossen werden. Dagegen konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 in Exosomen zu finden ist (Thery et al., 2001; Thery et al., 2002), während von seinem Verwandten Galectin-1 bekannt wurde, dass es über das sog. *Membrane blebbing* aus der Zelle gelangt (Cooper and Barondes, 1990).

Des Weiteren wurde bekannt, dass der N-Terminus von Galectin-3 essentiell für dessen Sekretion ist (Mehul and Hughes, 1997).

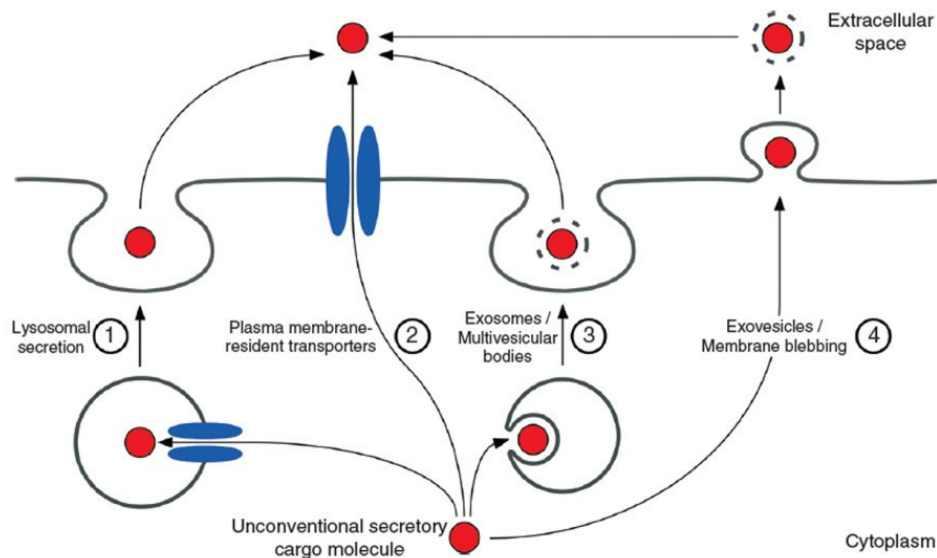


Abbildung 1.4: Unkonventionelle Sekretion

Postulierte unkonventionelle Sekretionsmöglichkeiten von Proteinen beinhalten sowohl vesikuläre als auch nicht-vesikuläre Prozesse. So können sekretorische Lysosomen wie sie in zytotoxischen T-Zellen vorkommen für eine Sekretion sorgen (1). Für diese Möglichkeit wären Transporter nötig, die auch direkt in der Zytoplasmamembran sitzen können (2). Eine dritte Möglichkeit besteht im Entlassen von Exosomen, die aus multivesikulären Körpern hervorgehen (3). Außerdem wurde ein Mechanismus diskutiert, bei dem Mikrovesikel durch sog. *Membrane blebbing* direkt an der Zytoplasmamembran entstehen und in den Extrazellulärraum entlassen werden (4) (Nickel, 2005).

1.2.3 Galectin-3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Mit seinen vielfältigen Aufgaben, etwa in der Zell-Adhäsion, der Zell-Migration, in der Zellzyklus-Regulation und als antiapoptotischer Faktor, ist Galectin-3 prädestiniert dafür, in der Entwicklung von Tumoren eine Rolle zu spielen. Bezüglich der Syntheserate von Galectin-3 wurde bereits in mehreren humanen Tumorarten eine signifikante Erhöhung festgestellt. Dies ist in Lymphomen, Hals- und Nacken-Tumoren, Schilddrüsen-Tumoren, Leber- und Magen-Tumoren gezeigt worden (Takenaka et al., 2004). Bei der Entstehung dieser Tumore werden dem Lektin diverse Beteiligungen zugedacht. So z. B. bei der Angiogenese und der Metastasierung. Galectin-3 auf der Zelloberfläche sorgt für eine Zell-Zell-Adhäsion (Inohara and Raz, 1995; Liu and Rabinovich, 2005). Genauer betrachtet konnte gezeigt werden, dass das Thomsen-Friedenreich-Antigen auf Tumorzellen in Verbindung mit Galectin-3 auf Endothelzellen eine tragende Rolle im Andocken von Tumorzellen an Endothelzellen spielt (Glinsky et al., 2001). Im Gegensatz zu der erhöhten Expression steht eine erniedrigte Galectin-3-Expression in Brust-, Eierstock- oder Prostata-Karzinomen (Takenaka et al., 2004). In Dickdarm-Karzinomen korreliert der Phosphorylierungsstatus von Galectin-3 mit dem metastatischen Potential

(Mazurek et al., 2000). Ein weiterer Grund für eine Beteiligung von Galectin-3 an der Entstehung einer neoplastischen Transformation liegt in seiner Rolle im **Wnt-Signalweg** begründet. In diesem Signalweg pendelt **β -Catenin** phosphorylierungsabhängig zwischen Zellkern und Zytoplasma. Im Zellkern bindet es an den Transkriptionsfaktor TCF und aktiviert die Expression der Gene für Cyclin D1 und C-Myc, welche maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus und der Genexpression beteiligt sind. Shimura *et al.* konnten zeigen, dass Galectin-3 in der humanen Brustkrebszelllinie BT549 mit β -Catenin interagiert (Shimura et al., 2004). Interessanterweise ist β -Catenin kein Glykoprotein. Also muss die Interaktion der beiden auf etwas anderem begründet sein. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte die Co-Immunopräzipitation von Galectin-3 mit einer weiteren Komponente im Wnt-Signalling beweisen. Dabei handelt es sich um das Wnt-Regulatorprotein Axin (Shimura et al., 2005).

1.2.4 P75 – Neurotrophinrezeptor

P75 ist ein 75 kDa großes Typ I-Membranprotein, das über seine C-terminale Transmembran-Domäne in der Membran verankert wird. Es besitzt sowohl N- als auch O-glykosidisch gebundene Zucker, wobei sich die O-Glykane in der Stab-Domäne in der Nähe zur Transmembran-Domäne anhäufen. In dieser Stab-Domäne (AS 168-218) liegen 6 O-Glykane aber keine N-Glykane vor (Breuza et al., 2002). P75 ist nicht mit Lipid-Rafts assoziiert, sondern verwendet eine andere apikale Sortierplattform. Deshalb wurde es ausführlich auf die Rolle seiner Glykosylierung im apikalen Transport hin untersucht. Zunächst stellte sich heraus, dass die N-Glykosylierung von P75 in dieser Hinsicht keine Rolle spielt. Die Deletion der O-Glykan reichen Stab-Domäne wiederum führte zum basolateralen Transport von P75 (Yeaman et al., 1997). Später wurde bekannt, dass Galectin-3 der apikale Sortierrezeptor für P75 in MDCK-Zellen ist. Dieses bindet an die O-Glykane im Bereich der Stabdomäne von P75 und sorgt für eine Bildung hochmolekularer Komplexe (Delacour et al., 2006; Delacour et al., 2007).

Der humane Neurotrophin-Rezeptor P75 ist ein exogenes Nicht-Lipid-Raft-Protein in MDCK-Zellen, und wird normalerweise in neuronalen Zellen synthetisiert und recycled (Deinhardt et al., 2007; Nykjaer et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine P75-GFP-Variante verwendet, die das GFP am C-Terminus trägt. Diese Topologie ermöglicht die Immunpräzipitation intakter P75-GFP-Vesikel.

1.2.5 Mx1 und die Dynamin-Superfamilie

Dynamine gehören zur Klasse der **großen GTPasen**. Mit einem Molekulargewicht ab ca. 75 kDa grenzen sie sich von den kleinen GTPasen wie z. B. Rab, Ran, Ras und Rho ab, die Molekulargewichte von 20-25 kDa besitzen. Wie ihr Name suggeriert, können GTPasen GTP binden und zu GDP hydrolysieren. Dabei nehmen sie, je nach Phosphorylierungszustand des gebundenen Nukleotids, verschiedene Arbeitszustände an. Die Bindungsaffinität für GTP der Mitglieder der Dynamin-Superfamilie ist vergleichsweise gering. Für GDP ist sie noch schwächer. Die Grundstruktur großer GTPasen beinhaltet eine **GTPase-Domäne** (orange), eine **Mittel-Domäne** (grün) und eine **GTPase-Effektor-Domäne** (GED, blau) (**Abb. 1.5**). Während die GTPase-Domäne für die GTP/GDP-Bindung und GTP-Hydrolyse zuständig ist, haben die Mittel-Domäne und die GED Einfluss auf die Regulation der GTPase-Aktivität und die **Oligomerisierung**. Klassische Dynamine wie Dynamin 1, 2 und 3 tragen zusätzlich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne), mit der sie an Phospholipide binden können und eine Prolin-reiche Domäne (PRD), die in der Lage ist, an Proteine mit SH3-Domäne zu binden. Beide Motive dienen dazu, klassische Dynamine an bestimmte Orte in der Zelle zu dirigieren, wo sie ihrer eigentlichen Aufgabe nachgehen, dem Abknospen von Vesikeln. Dabei hilft ihnen ihre Fähigkeit zu oligomerisieren. Die Oligomerisierung wiederum hat einen Einfluss auf die GTPase-Aktivität der Mitglieder der Dynamin-Superfamilie. Während die GTPase-Aktivität kleiner GTPasen von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) abhängt, so steigern Dynamin-Superfamilien-Mitglieder ihre GTP-Hydrolyserate durch ihre Oligomerisierung.

Dynamine und Dynamin-ähnliche Proteine sind an zahlreichen Prozessen beteiligt, in denen verschiedene Membranbereiche voneinander abgeschnürt werden. So sind klassische Dynamine z. B. an der Abschnürung von Vesikeln der Zytoplasmamembran, des TGNs und von Endosomen beteiligt. Typisches Beispiel hierfür ist das Mitwirken von Dynamin-2 an sowohl der Clathrin-abhängigen Endozytose als auch der Abschnürung von Caveolae an der Zytoplasmamembran. Des Weiteren wird Dynamin-2 eine Funktion bei der Abschnürung von P75-Vesikeln aus dem TGN zugewiesen (Kreitzer et al., 2000; Salvarezza et al., 2009). Dynamin-ähnliche Proteine wie OPA1 oder Mitofusin sind an der Teilung bzw. Fusion von Mitochondrien beteiligt.

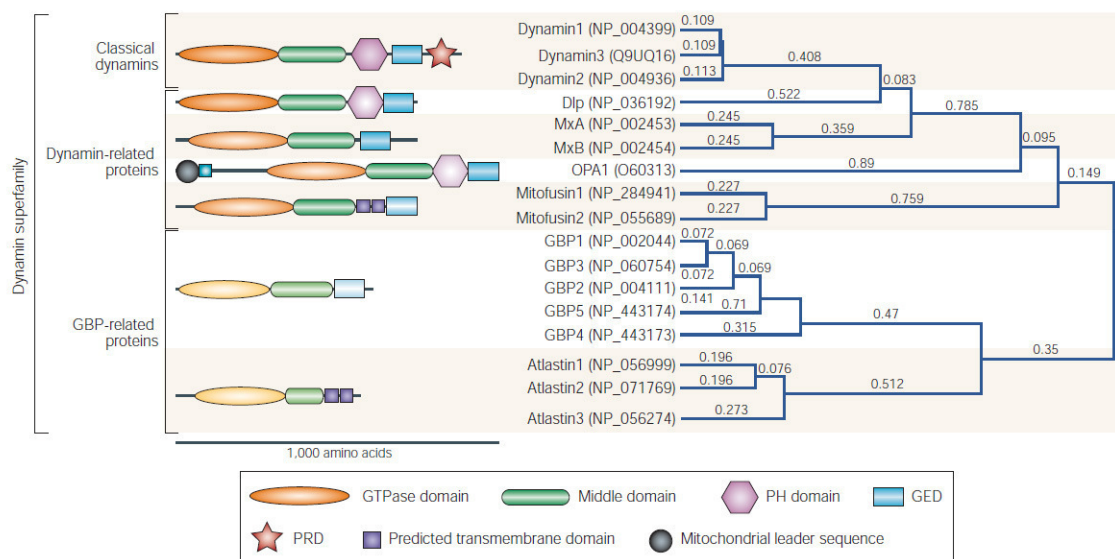


Abbildung 1.5: Domänenstruktur der humanen Dynamin-Superfamilie

Die einzelnen Domänen werden als Symbole mit absteigender Farbintensität dargestellt, wobei diese mit der Sequenzidentität korreliert. Alle Dynamine besitzen eine GTPase-Domäne, welche GTP bindet und hydrolysiert, eine Mittel- und eine GTPase-Effektordomäne (GED), die in die Oligomerisierung involviert sind und die GTPase-Aktivität stimulieren. Die meisten Dynamine besitzen eine Domäne zur Interaktion mit Lipidmembranen. Dies ist entweder eine *Pleckstrin homology* Domäne (PH domain), eine Transmembrandomäne oder eine andere Sequenz für eine Lipidbindung. Klassische Dynamine enthalten eine Prolin-reiche Domäne (PRD) am C-Terminus, die mit SH3-Domänen interagieren kann. Dlp: *Dynamin-like protein 1*, GBP1: *guanylate-binding protein 1*, OPA1: *optic atrophy 1* (Praefcke and McMahon, 2004).

Eine Sonderstellung in der Dynamin-Superfamilie nehmen die Mx-Proteine ein. Sie besitzen weder eine PRD- noch eine PH-Domäne. Ursprünglich wurden sie als antivirale Proteine entdeckt, die synthetisiert werden, wenn der Organismus eine Interferonantwort auf eine Virusinfektion liefert. Beim Menschen z. B. gegen Infektionen mit Influenza- und Bunyaviren (Habjan et al., 2009; Haller et al., 2007). Der genaue Wirkmechanismus ist dabei noch unbekannt. Möglicherweise bindet MxA (humanes Mx1 = MxA) an virale Proteine und macht diese auf diese Weise inert (Kochs et al., 2002; Reichelt et al., 2004). MxA kann Homo-Oligomere aus bis zu 30 Monomeren bilden, was laut Kochs *et al.* die Speicherform von MxA sein könnte, während die monomere Form die antivirale Variante sei (Haller and Kochs, 2002). Interessanterweise existiert auch in *A. thaliana* eine Mx-Variante (van der Blik, 1999). In aufgereinigter Form sind Mx-Proteine genau wie klassische Dynamine dazu in der Lage, Membranen zu **tubulieren**. MxA bildet trotz fehlender PRD- und PH-Domäne aus zunächst sphärischen Liposomen verzweigte Tubuli (Accola et al., 2002). Ähnliches gilt für das verwandte DLP1, welches ebenfalls weder eine PRD noch eine PH-Domäne besitzt (Yoon et al., 2001). Diese Tatsache und zwei weitere legen den Schluss nahe, dass MxA nicht nur antivirale Eigenschaften hat, sondern auch in anderen zellulären Prozessen beteiligt ist. So wird das Hundehomologe Mx1 in MDCK-Zellen konstitutiv exprimiert, auch ohne Interferoninduktion (Seitz et al., 2010). Zudem konnte

ihm keine Aktivität gegen Influenzaviren nachgewiesen werden. Außerdem ist für andere Dynamin-ähnliche Proteine wie dem VPS1 aus der Bäckerhefe und seinem humanen Homolog DRP1 bereits eine Rolle im intrazellulären Proteintransport nachgewiesen worden (Imoto et al., 1998; Rothman et al., 1990). Diesbezüglich wurde auch eine Assoziation von humanem bzw. Schaf-Mx1 mit β -Tubulin beschrieben (Horisberger, 1992; Racicot and Ott, 2010). Des Weiteren scheint Schaf-Mx1, ähnlich wie Galectin-3, einem unkonventionellen Sekretionsweg zu folgen (Toyokawa et al., 2007a). Möglicherweise dient es sogar als Regulator in diesem Vorgang (Toyokawa et al., 2007b). Auch im umgekehrten Weg, der Endozytose, wurde eine Beteiligung von Mx1 beobachtet. In Schweinezellen blockiert Mx1 den Proteintransport von frühen zu späten Endosomen (Palm et al., 2010), während in CHO-Zellen das humane MxA einen störenden Einfluss auf den Transport von Transferrin nimmt (Jatiani and Mittal, 2004).

1.2.6 Alphakinase-1 (ALPK1)

Die Alphakinase-1 (ALPK1) ist Bestandteil einer relativ neu entdeckten Gruppe von Kinasen, die ihr Substratprotein innerhalb von α -helikalen Strukturen phosphorylieren (Ryazanov et al., 1999). Sie werden deshalb auch Alphakinasen genannt. Die ALPK1 besitzt ein Molekulargewicht von 137 kDa. Ihre Expression beschränkt sich auf Gewebe des Dünndarms, des Magens, der Niere und der Lymphknoten. Herkömmliche Proteinkinasen phosphorylieren ihr Substrat an Ser/Thr- oder Tyr-Resten und besitzen zwar keine Sequenz- aber eine Strukturähnlichkeit mit Alphakinasen.

ALPK1 wurde, genau wie Annexin II, in immunpräzipitierten SI-Vesikeln durch Massenspektrometrie gefunden und die Auswirkung von deren *knock-down* auf den Transport des apikalen Lipid-Raft-Proteins SI untersucht (Heine et al., 2005; Jacob et al., 2004). Hier zeigte sich, dass der Ausfall der ALPK1 das Zurückhalten der SI im Zellinneren nach sich zog. Als Substrat für die ALPK1 wurde das Motorprotein **Myosin-1** identifiziert, während die verwandte α -Kinase TRPM7 Myosin-2a phosphoryliert (Clark et al., 2006).

1.3 Das Endomembransystem

1.3.1 Vesikulärer Transport

Intrazellulärer Proteintransport findet meist mit Hilfe von Vesikeln statt, welche vom Donorkompartiment zum Akzeptorkompartiment oder der Zytoplasmamembran wandern. An diesem Prozess sind zahlreiche Proteine beteiligt, die für die Entstehung, den Transport und die Fusion des Vesikels sorgen (**s. Abb. 1.6**). Zunächst werden bei der Bildung des Vesikels Mantelproteine rekrutiert. Dies können z. B. Clathrin oder COP I- und COP II- spezifische Proteine sein. Die zu transportierenden Proteine (Cargoproteine) treten dabei entweder als Transmembranprotein selbst über Adapterproteine in Kontakt mit den Mantelproteinen oder werden als lösliches Protein über andere transmembranständige Proteine mit den Adapterproteinen und Mantelproteinen verknüpft. Beim Trennvorgang von der Donormembran ist das mechano-chemische Protein **Dynamin** beteiligt, welches durch Anlagerung an den Vesikelhals und GTP-Hydrolyse dazu in der Lage ist, das Vesikel von der Donormembran zu trennen. Der anschließende Transport findet entweder über Motorproteine entlang des Zytoskeletts statt oder durch Diffusion. Die spezifische Erkennung der Ziellmembran erfolgt u. a. durch Mitglieder der kleinen GTPasen-Familie, den **Rab-Proteinen**, welche an einen Rezeptor in der Ziellmembran binden. Dort angelangt, bilden sich Coiled-coil-Strukturen zwischen den v-SNAREs auf den Vesikeln mit t-SNAREs auf der Ziellmembran. Dadurch entsteht ein sehr enger Kontakt zwischen den beiden Membranen, was schließlich zum Verschmelzen der beiden führt (Cai et al., 2007; Pocard et al., 2007).

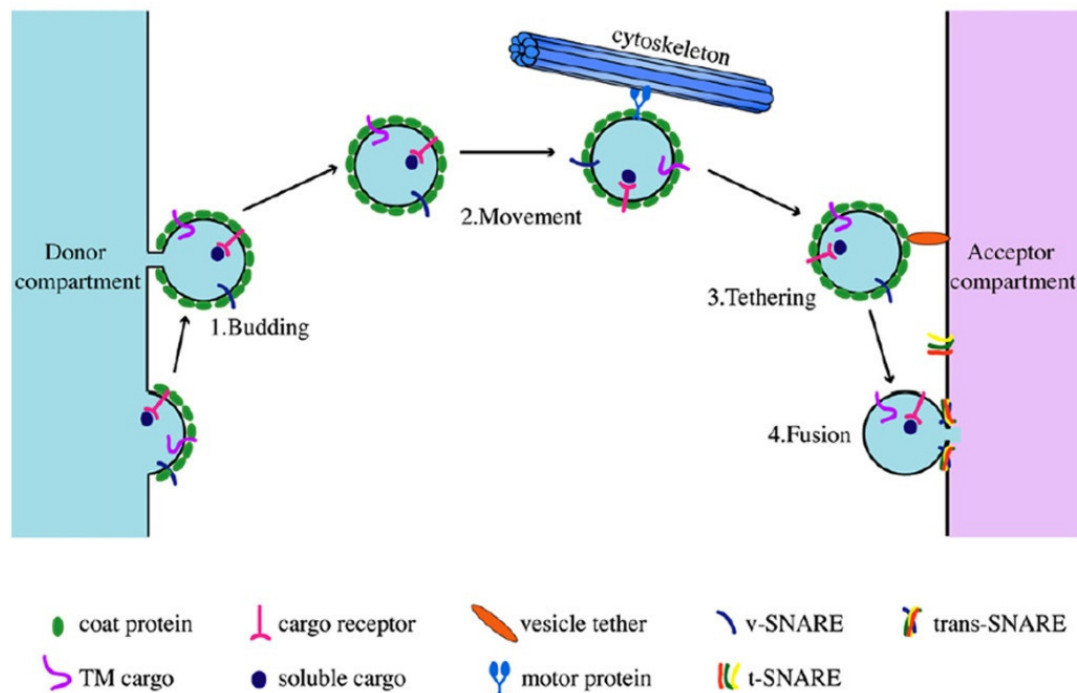


Abbildung 1.6: Vesikulärer Transport

Der Transport von Vesikeln lässt sich in vier verschiedene Phasen gliedern. 1. Das Abknospen (Budding) am Donorkompartiment. Hier bildet sich eine Hülle aus Mantelproteinen. Lösliche Cargoproteine werden über Adapter in das entstehende Vesikel gebunden, Transmembrancargoproteine können direkt in Kontakt mit Mantelproteinen treten. An der eigentlichen Abtrennung des Vesikels ist das mechano-chemische Protein Dynamin beteiligt (nicht abgebildet). 2. Die Bewegung des Vesikels findet am Zytoskelett oder per Diffusion statt. 3. Das Andocken an die Akzeptormembran passiert mit Hilfe von Tetheringproteinen. Außerdem sind an der Zielfindung Rab-Proteine beteiligt (nicht abgebildet). Bei der Fusion des Vesikels mit der Ziellmembran bilden v-SNAREs auf dem Vesikel Komplexe mit t-SNAREs in der Ziellmembran. Die entstehenden *Coiled-coil* SNARE-Komplexe (hier: trans-SNARE) sorgen für einen engen Kontakt der beiden Membranen, was schließlich zur Verschmelzung führt. TM: Transmembrane; v: vesicle; t: target; SNARE: soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (Cai et al., 2007).

1.3.2 Endozytose

Die meisten Zellen besitzen die Fähigkeit, diverse Substanzen aus dem Extrazellulärraum durch Einstülpungen der Zytoplasmamembran aufzunehmen. Ähnlich wie beim intrazellulären Transport spielt dabei die Entstehung von Vesikeln eine tragende Rolle. Bei der Endozytose kann man dabei mindestens zwei verschiedene Typen unterscheiden. Zum einen die **Clathrin-abhängige Endozytose** und zum anderen die Endozytose via **Caveolae (Abb. 1.7)**. Bei der ersteren handelt es sich um einen Vorgang, bei dem sich sogenannte *Clathrin coated pits* (CCPs) bilden, während die aufzunehmenden

Cargoproteine über den AP-2-Komplex an den Clathrinmantel gebunden werden. Beim Abknospen des Endozytosevesikels ist **Dynamin** beteiligt. Dies gilt sowohl für Clathrin-abhängige Endozytoseereignisse, als auch für Clathrin-abhängige Transportprozesse vom TGN aus. Allerdings sind dann andere Adapterproteine beteiligt. Der zweite Endozytosemechanismus findet in speziellen Lipid-Raft-Domänen auf der Zytoplasmamembran statt (Verkade et al., 2000). Zwei typische Proteine in diesen Domänen sind Caveolin und Flotillin, die allerdings nicht beide gleichzeitig dort vorkommen (Glebov et al., 2006; Hansen and Nichols, 2009). Caveolin wurde in diesem Zusammenhang als erstes entdeckt und war namensgebend. Auch bei diesem Vorgang ist für das Abschnüren des Endozytosevesikels **Dynamin** notwendig.

Vesikel, die auf eine der beiden erwähnten Arten entstanden sind, werden im Anschluss Teil des endosomalen Systems, auf das ich im nächsten Abschnitt näher eingehen werde.

Für die Hemmung beider Endozytosewege stehen spezifische Substanzen zur Verfügung. So lässt sich die Clathrin-abhängige Endozytose beispielsweise durch die Chemikalie **Chlorpromazin** inhibieren. Für die Unterbindung der Endozytose durch Caveolae wird häufig das aus dem Bakterium *Streptomyces filipinensis* stammende **Filipin** benutzt (Ivanov, 2008).

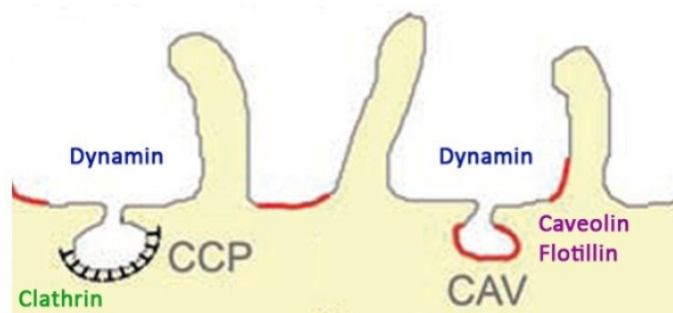


Abbildung 1.7: Endozytosemechanismen

Abgebildet sind zwei verschiedene Arten der Endozytose. Zum einen gibt es eine Clathrin-abhängige Endozytose, bei der das Mantelprotein Clathrin ein käfigartiges Gerüst an die Zytoplasmamembran baut, welches über Adapterproteine mit den aufzunehmenden Proteinen verbunden ist (nicht dargestellt). So entsteht eine Membrankrümmung und schließlich eine Einstülpung, welche mit Hilfe von Dynamin von der Zytoplasmamembran gespalten wird. Dagegen steht die Endozytose über Caveolae. Dies sind Zytoplasmamembraneinstülpungen in Lipid-Raft-Domänen (rot), die die dafür charakteristischen Proteine Caveolin und Flotillin tragen. Auch an deren Abknospung ist Dynamin beteiligt. CCP: *Clathrin coated pit*; CAV: Caveolae (abgeändert nach (Delacour and Jacob, 2006)).

1.3.3 Endosomale Kompartimente

Polare Epithelzellen verfügen über ein komplexes System von miteinander kommunizierenden endosomalen Kompartimenten, das u. a. von apikalen Proteinen als Durchgangsstation auf dem Weg zur Zytoplasmamembran durchlaufen wird (Cullen, 2008; Folsch et al., 2009). Dabei kann man

verschiedene Endosomentypen anhand ihrer unterschiedlichen typischen Proteinmarker voneinander trennen. Frühe Endosomen, die mit endozytotischen Vesikeln verschmelzen, enthalten das **Early Endosome Antigen 1** (EEA-1) und außerdem **Rab4**. Auf die Aufgabe dieser kleinen GTPasen wurde in Abschnitt 1.3.1 eingegangen. Vom frühen Endosom aus werden manche Proteine nach dem Transport über das späte Endosom im Lysosom abgebaut. Andere gelangen in einem Recycling-Mechanismus wieder direkt zur Zytoplasmamembran. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, über das apikale Recycling-Endosom zurück an die Zelloberfläche transportiert zu werden. Ein typischer Marker für dieses Kompartiment, dem außerdem auch eine tragende Rolle im Sortieren von apikalen und basolateralen Proteinen zugesprochen wird (Cresawn et al., 2007; Thompson et al., 2007), ist **Rab11**. Neben diesem Recycling-Weg konnte auch ein vorwärtsgerichteter Proteintransport vom TGN aus durch das gemeinsame Recycling-Endosom (nicht abgebildet) bzw. über die basolaterale Zytoplasmamembran festgestellt werden, in dem **Rab8** vorzufinden ist (Ang et al., 2003; Sato et al., 2007). Von den apikalen Markerproteinen LPH und SI ist bekannt, dass sie auf ihrem Weg zur apikalen Zytoplasmamembran Rab4, Rab8 und Rab11-positive Kompartimente durchlaufen (Cramm-Behrens et al., 2008).

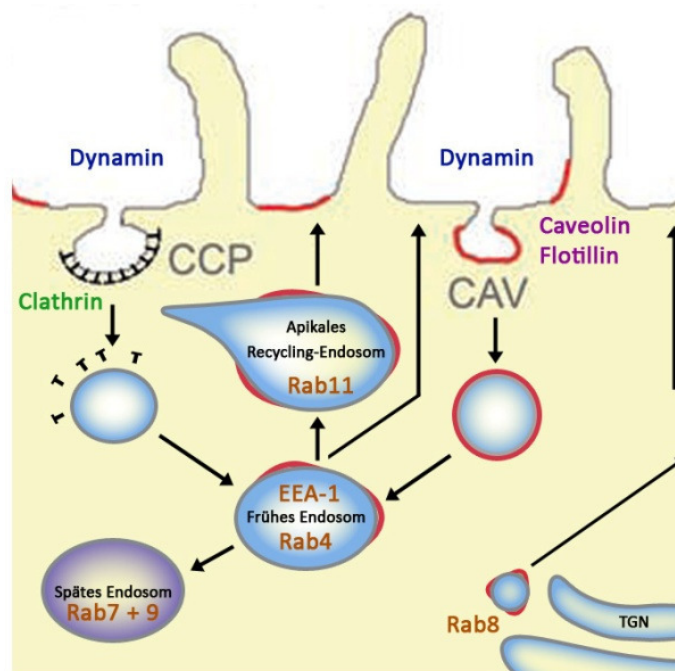


Abbildung 1.8: Endosomale Kompartimente am apikalen Zellpol und ihre Markerproteine

Abgebildet ist nur ein Teil der im polaren Proteintrafficking relevanten endosomalen Kompartimente. Durch Endozytose aufgenommene Proteine gelangen zunächst in das frühe Endosom, von wo sie entweder weiter zum saureren späten Endosom und schließlich ins Lysosom (nicht abgebildet) gelangen. Vom frühen Endosom aus kann aber auch ein Recycling zur Zytoplasmamembran stattfinden. Dies kann entweder auf direktem Wege oder aber über das apikale Recycling-Endosom passieren. Lipid-Rafts sind als rote Strukturen markiert. Vom TGN aus existiert auch ein vorwärtsgerichteter Proteintransport über das Gemeinsame Recycling-Endosom oder die basolaterale Zytoplasmamembran. CAV: Caveolae; CCP: *Clathrin coated pits*; EEA-1: *Early Endosome Antigen 1* (abgeändert nach (Delacour und Jacob, 2006)).

Viele Publikationen lassen vermuten, dass es sich bei den endosomalen Kompartimenten um ein sich im Fluss befindliches **Netzwerk** handelt. So befindet sich z. B. Aquaporin-2, ein Protein aus dem Sammelrohr des Nierenepithels, in einem subapikalen Speicherkompartiment, welches außerdem den Recycling-Endosomen-Marker Rab11 enthält. Konfokalmikroskopische Aufnahmen lassen auf ein tubulo-vesikuläres System dicht unter der apikalen Zytoplasmamembran schließen (Tajika et al., 2004; Takata et al., 2008). Dieses subapikale Kompartiment wurde auch bereits in *Drosophila melanogaster* beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass für den Austritt von Proteinen aus diesem Kompartiment das Dynamin-Homologe **Shibire** nötig ist (Hoekstra et al., 2004). Aufnahmen mit dem Raster-Elektronenmikroskop von Epithelzellen des proximalen Tubulus der Rattenniere geben einen dreidimensionalen Eindruck der subapikalen Region. Hier zeigt sich ein verzweigtes Netzwerk aus endosomalen Strukturen dicht unterhalb der apikalen Zytoplasmamembran (**Abb. 1.9**) (Hatae et al., 1997).

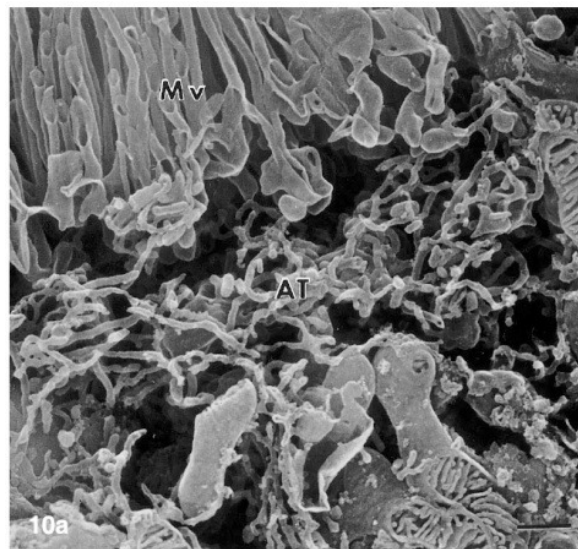


Abbildung 1.9: Das subapikale tubuläre Netzwerk im proximalen Tubulus

Dicht unter der Zelloberfläche von Zellen aus dem proximalen Tubulus der Ratte befindet sich ein tubulo-vesikuläres Netzwerk endosomaler Struktur wie diese Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme zeigt. Mv: Mikrovilli; AT: Apikale Tubuli Maßstab: 250 nm (Hatae et al., 1997)

1.4 Fragestellungen dieser Arbeit

Die Fragestellung dieser Arbeit kann in vier Teilaspekte untergliedert werden. Anstoßgebend für die Anfertigung dieser Dissertation war die Entdeckung des von Galectin-3 abhängigen Transportweges zur apikalen Zytoplasmamembran. Zum Zeitpunkt der Publikation dieses Sortierprozesses blieb die **Frage nach der Art der Vesikel, deren Zusammensetzung, Bildung und Transport** offen **(1)**. Außerdem war das weitere **Schicksal von Galectin-3 nach Beendigung des Sortierprozesses** nicht geklärt. Dies ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit **(2)**. Des Weiteren wurde in zwei kleineren Teilprojekten auf die **Rolle der AKPK1 im apikalen Proteintransport** in Mäusedünndärmen eingegangen **(3)** und die **Rolle von Galectin-3 in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen** näher beleuchtet **(4)**.

1) Mit Hilfe der MALDI-TOF-Analyse sollten Komponenten von Transport-Vesikeln im Lipid-Raft-unabhängigen Transportweg ermittelt werden. Dabei lag das Augenmerk auf potentiellen Motoren, Adapterproteinen, Hüllproteinen oder Dynaminen, die für die Bildung, Abschnürung und den Transport der Vesikel eine Rolle spielen könnten. Hierfür wurden P75-GFP-Vesikel zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verlassen des Trans-Golgi-Netzwerkes aufgereinigt und massenspektrometrisch untersucht. Mit diesen Vesikeln wurden außerdem Western-Blot-Analysen durchgeführt. Des Weiteren wurden diverse Mikrokopiertechniken wie die konfokale Laserscanning Mikroskopie und die TIRF-Mikroskopie genutzt, um den von Galectin-3 initiierten Transportweg zu beobachten. Dabei wurden die in der MALDI-TOF-Analyse identifizierten Proteine zusammen mit Galectin-3 oder den von Galectin-3 sortierten Proteinen verwendet.

2) Um den Weg von Galectin-3 nach dem Sortierprozess in der Zelle zu verfolgen, wurden ebenfalls mikroskopische Aufnahmen gemacht. Zur Beantwortung der Fragestellung der möglichen Exo- und Endozytose des Sortierrezeptors eignete sich besonders die TIRF-Mikroskopie, mit der speziell der Bereich der Zytoplasmamembran und ein schmaler Bereich darunter betrachtet werden kann. Abgabe und Aufnahme von Galectin-3 aus bzw. in die Zelle wurden außerdem biochemisch untersucht.

3) In ALPK1-Knockout-Mäusen wurde mikroskopisch der korrekte Transport diverser apikaler Proteine des Lipid-Raft-abhängigen und Lipid-Raft-unabhängigen Transportweges kontrolliert.

4) Unter Zuhilfenahme proteinbiochemischer Methoden wie Western-Blot und Co-Immunopräzipitationen wurde der Rolle von Galectin-3 bei der Entstehung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen des Menschen nachgegangen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung diverser Zelllinien

Für die durchgeführten Experimente wurden folgende Zelltypen und Medien verwendet:

Zelllinie	Eigenschaften	Medium
MDCK II Wildtyp (WT)	Polare Epithelzelle aus der Hundeniere	MEM 5 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin
MDCK _{P75-GFP}	MDCK II-Zelllinie, die mit einem P75-GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde	DMEM high glucose (4,5g/l) 10 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 0,5 mg/ml G418
MDCK _{Gal3-DsRed}	MDCK II-Zelllinie, die mit einem Gal3-DsRed exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde	MEM 5 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 0,2 mg/ml Zeocin
MDCK _{P75-GFP/Gal3-DsRed}	MDCK II-Zelllinie, die mit einem P75-GFP und einem Gal3-DsRed exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde	DMEM high glucose (4,5g/l) 10 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 0,5 mg/ml G418 0,2 mg/ml Zeocin
MDCK _{Gal3-DsRed/Cav1-YFP} MDCK _{Gal3-DsRed/Flot1-GFP} MDCK _{Gal3-DsRed/Clathrin-CFP}	MDCK II-Zelllinie, die mit einem Gal3-DsRed und einem Cav1-YFP, Flot-GFP oder Clathrin-CFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde	MEM 5 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 0,5 mg/ml G418 0,2 mg/ml Zeocin
MDCK _{Mx1-GFP}	MDCK II-Zelllinie, die mit einem Mx1-GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert wurde	DMEM high glucose (4,5g/l) 10 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 0,5 mg/ml G418

Tabelle 2.1: Zelllinien und verwendete Medien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit.

Das MDCK-Zell-Modell

MDCK II-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney) sind polare Zellen aus dem Nierenepithel des Hundes, die in Kultur gebracht ein Monolayer ausbilden. Sie wurden von S.H. Madin und N.B. Darby vermutlich aus dem distalen Tubulus oder dem Sammelrohr eines Cockerspaniel isoliert. MDCK-Zellen eignen sich hervorragend für Beobachtungen im polaren Proteintransport. Im Monolayer wird der apikale Teil der Plasmamembran durch die Einführung von Tight Junctions vom basolateralen Teil getrennt. In geeigneten Kulturgefäßen (auf Filtern) kann man apikale und basolaterale Plasmamembran, z. B. in Biotinylierungs- oder Protease-Assays, getrennt voneinander behandeln. In MDCK-Zellen wurden die grundlegenden Techniken für die Betrachtung des polaren Proteintransports entwickelt. Dieser Zelltyp ist nach ca. 2 Tagen Kultivierung konfluent. Nach 5 Tagen erreichen die Zellen Polarität. Sie nehmen dann eine hexagonale Grundfläche ein.

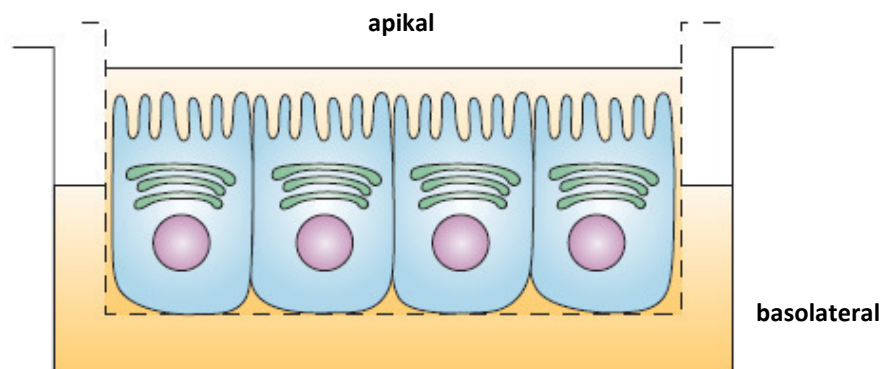


Abbildung 2.1: Kultivierung von MDCK-Zellen auf PET-Filtern

MDCK-Zellen bilden auf festen Substraten wie Plastikschaalen oder PET-Filtern ein homogenes Monolayer aus. Der apikale Teil mit Mikrovilli ragt nach oben, der basolaterale Teil befindet sich auf dem Substrat. Auf PET-Filtern kultiviert, kann man apikale und basolaterale Membran mit unterschiedlichen Medien/Substanzen behandeln. (Rodriguez-Boulant et al., 2005).

2.1.2 Passagieren von Zellen

Alle Zelllinien wurden im Verhältnis 1:4 gesplittet, wenn sie 80-100 % Konfluenz erreicht hatten. Dazu wurden nach einmaligem Waschen mit PBS 2,5 ml Trypsin/EDTA auf jede Schale (10 cm) gegeben und diese für 15-30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Schalenboden wurden diese in 3 ml des jeweiligen Mediums aufgenommen und für 5 min bei 800

rpm pelletiert. Das Pellet wurde wiederum in 4 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und zu Portionen von 1 ml auf neue Schalen mit 9 ml Medium gegeben.

PBS (*Phosphate buffered saline*):

140 mM NaCl
2,5 mM KCl
6,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM K₂HPO₄
pH 7,4; autoklaviert

2.1.3 Einfrieren/Auftauen von Zellen

Zellen können nach sorgfältigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff gelagert und wieder aufgetaut werden. Zum Einfrieren wurden 2 ml Trypsin/EDTA auf jede Schale gegeben, für 15-30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und in 3 ml Medium aufgenommen. Dann wurden die Zellen für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, das Pellet in 1 ml Einfriermedium (80 % MEM; 10 % FKS; 10 % DMSO) in ein Kryoröhrchen aufgenommen und für 2 h bei -20°C gelagert. Nach einem Tag bei -80°C wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.1.4 Transfektion von MDCK-Zellen (Lipofektion)

Zellen, die ein bestimmtes Protein nicht von sich aus synthetisieren, können dazu gebracht werden, die entsprechende Erbinformation dafür in Form eines Plasmids aufzunehmen. Den Prozess der Aufnahme von DNA in eine Eukaryotenzelle nennt man Transfektion. Das transfizierte Plasmid enthält dabei das einzubringende Gen des Interesses und meistens ein weiteres Gen, welches für eine Antibiotika-Resistenz kodiert. Mit Hilfe dieser erworbenen Resistenz können transfizierte Zellen von untransfizierten unterschieden werden. Durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums kann man die Zellen eliminieren, die das Plasmid nicht aufgenommen haben. Grundsätzlich kann man zwischen einer transienten und einer stabilen Transfektion unterscheiden. Bei einer stabilen Transfektion wendet man das oben beschriebene Selektionsverfahren an. Dies führt schließlich zum Einbau der transfizierten DNA ins Zellgenom. Im Fall der transienten Transfektion behandelt man die Zellen nicht mit einem Selektionsmittel. Die Redundanz der eingebrachten DNA führt schließlich zu deren Abbau.

Als Standard-Transfektionsmethode in dieser Arbeit diente die Lipofektion mittels Lipofectamin2000 (Invitrogen). Bei diesem Verfahren wird die zu transfizierende DNA in mikroskopisch kleine Lipid-Tropfen verpackt. Diese fusionieren mit der Zytoplasmamembran und die DNA gelangt ins Zellinnere.

Als Standard-Protokoll diente die folgende Vorgehensweise: 5 µg DNA wurden mit 1,5 ml MEM (-/-) (d.h. ohne Antibiotika, ohne FKS) aufgenommen. In einem separaten Gefäß wurden 10 µl Lipofectamin2000 mit 1,5 ml MEM (-/-) gemischt. Beide Flüssigkeiten wurden nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur miteinander vermischt und weitere 30 min gemeinsam bei RT inkubiert. Hierbei wurde die DNA in die Lipid-Vesikel aufgenommen. Während dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen, die eine etwa 30 %ige Konfluenz aufwiesen zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Lipid-DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben. Darauf folgte eine sechsstündige Inkubation der Zellen bei 37°C. Das Volumen des Transfektionsansatzes wurde an das jeweilige Volumen des Zellkulturgefäßes angepasst.

Kulturgefäß	Tranfektions-Volumen
10 cm Schale	3 ml
6 Well Schale	1,5 ml
24 Well Schale	200 µl

Tabelle 2.2: Transfektions-Volumina

2.1.5 RNA-Interferenz (siRNA)

Die Transfektion von Zellen mit siRNA (*small interfering RNA*) ist eine Methode, gezielt die Translation bestimmter Gene herabzusetzen. Da die Gene nicht vollständig ausgeschaltet werden, spricht man von einem „*knock-down*“, nicht von einem „Knockout“. Für den siRNA *knock-down* konzipiert man kurze dsRNA-Stücke von 21-23 bp Länge mit 2 bp Überhang am 3'-Ende, die homolog zu Abschnitten der mRNA des herab zu regulierenden Gens sind. In der Zelle bilden siRNAs und endogene Proteine den RISC Komplex (RNA induced silencing complex). Der jeweilige antisense siRNA-Strang leitet RISC zur komplementären mRNA (**Abb. 2.2, Weg 3**) Diese wird daraufhin geschnitten und es findet keine Transkription statt. Um die Zerstörung der transfizierten siRNA durch die eigene Säugetier spezifische Abwehr gegen Viren zu umgehen, hält man die Größe der siRNA unter der kritischen Zahl von 30 bp. Größere RNA-Moleküle werden von der Zelle abgebaut. Außerdem kann die Zelle mit DNA-Plasmiden transfiziert werden, die *short hairpin RNAs* (shRNAs) kodieren. Diese werden dann von der zytoplasmatischen Nuklease DICER in kleinere siRNAs geschnitten (**Abb. 2.3, Weg 3**).

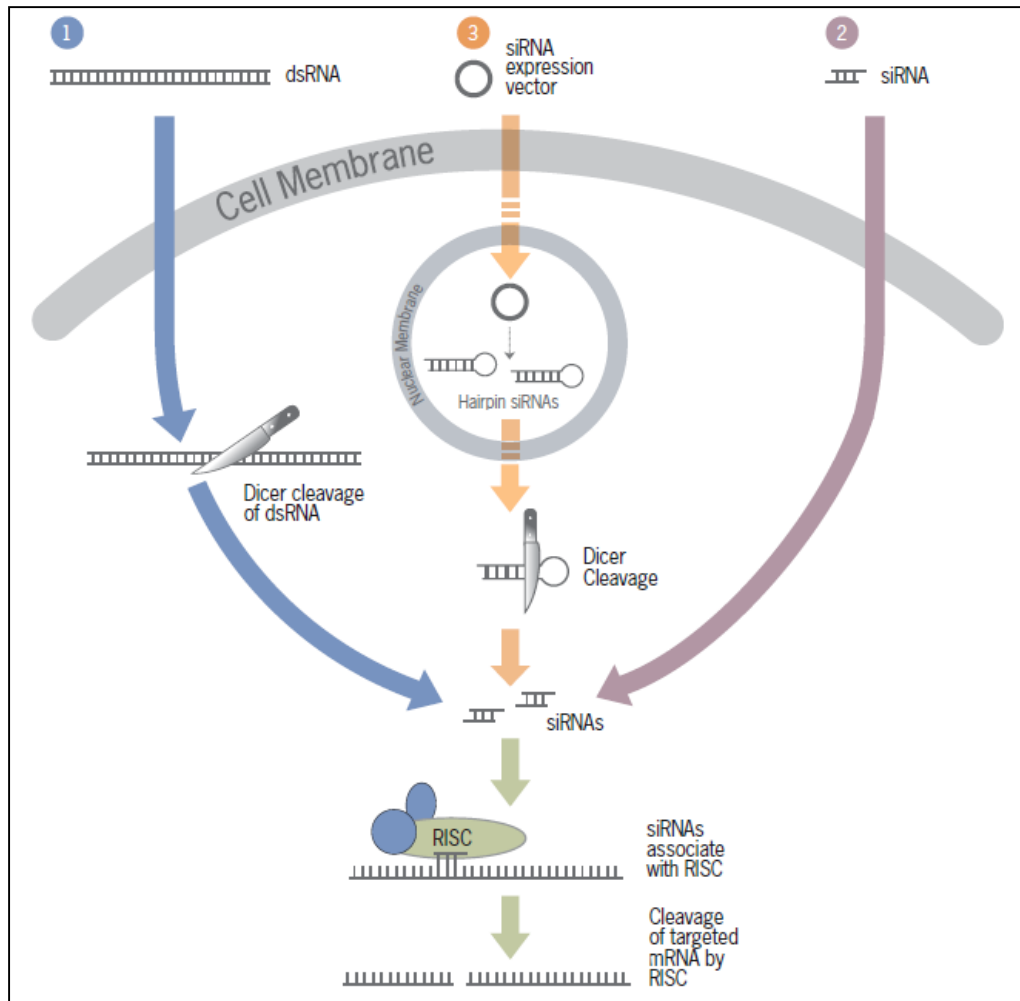


Abbildung 2.2: Funktionsmechanismen von siRNA

Abgebildet sind drei verschiedene Wege der RNA-Interferenz. Weg 1 kommt nicht in Säugerzellen vor. Hier können auch längere dsRNA-Stücke verwendet werden. In Säugerzellen ruft das Einbringen von dsRNA mit einer Länge von über 30 bp eine antivirale Abwehrreaktion hervor, die die dsRNA zerstört. Deshalb werden entweder shRNA kodierende DNA-Plasmide oder kurze siRNAs transfiziert (Weg 2 + 3). Nach der Prozessierung der shRNAs durch DICER zu siRNAs bilden diese gemeinsam mit zelleigenen Proteinen den RISC-Komplex. Geführt durch den antisense-RNA-Strang gelangt der RISC-Komplex zur komplementären mRNA. Diese wird dann geschnitten und kann nicht mehr transkribiert werden (AMBION, 2006).

Um den Einfluss von Mx1 auf den apikalen Transport diverser Proteine zu untersuchen, wurden *knock-down* Experimente durchgeführt. Da die Degradierung der siRNA durch RNAsen eine Gefahr darstellt, wurde unter erhöhten Sauberkeitsbedingungen gearbeitet. Es wurden separate Spitzen, Reaktionsgefäße und Pipetten benutzt. Durch die zweifache Transfektion der Zellen an Tag 2 und 5 nach Aussähen wurde ein besserer und kontinuierlicherer *knock-down* von Mx1 gewährt. Die eigentlichen Experimente wurden dann an Tag 6 durchgeführt. Die Transfektion der siRNAs erfolgte

mittels Lipofektion (s. Kapitel 2.2). Ein Transfektionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

3 ml MEM (-/-)
10 µl Lipofectamin200
1 µl siRNA (200 µM)

RNA-Interferenz-Experimente wurden mit folgenden siRNA-Duplicates gegen Mx1 durchgeführt:

5'-AUGGAGCGCUGUGAUUGAAtt-3' (*Sense*)
5'-UUCAAUCACAGCGCUCCAUtt-3' (*Antisense*)

Als Kontrolle wurde zu jedem Experiment eine siRNA gegen die in MDCK-Zellen nicht exprimierte Luciferase verwendet:

5'-CGUACGCGGAAUACUUCGATT-3' (*Sense*)
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGTT-3' (*Antisense*)

Für alle siRNAs wurde eine Konzentration von 200 µM in Nuklease freiem Wasser eingestellt. Anschließend wurden Aliquots bei -20°C eingefroren.

2.2 Allgemeine biochemische Methoden

2.2.1 SDS-PAGE

SDS denaturiert Proteine und lädt sie proportional zu ihrem Molekulargewicht negativ auf. Mit SDS behandelte Proteine wandern deshalb in einem Polyacrylamidgel, an das eine Spannung angelegt wurde, zum Pluspol. Durch das Vorschalten eines niederprozentigen Sammelgels mit geringerem pH erzeugt man eine gleichmäßige Startlinie für alle Proteine. Im Trenngel trennen sich dann die Proteine gemäß ihres Molekulargewichtes auf. Solche mit hohem Molekulargewicht laufen langsamer durch die Poren des Gels, als solche mit niedrigem. Durch das Variieren der PAA-Konzentration kann man das Auflösungsvermögen des Gels individuell an das nachzuweisende Protein anpassen. Für große Proteine wählt man hochprozentige, für kleine Proteine niederprozentige Gele (Laemmli, 1970). Zusätzlich zum SDS werden Proteine durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. DTT löst Disulfidbrücken auf.

	Trenngel (12 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (8 %)	Trenngel (6 %)	Sammelgel (5 %)
Komponente	Volumen in ml	Volumen in ml	Volumen in ml	Volumen in ml	Volumen in ml
dH ₂ O	8,2	9,9	11,5	13,2	5,5
PAA (30 %)	10	8,3	6,7	5,0	1,3
Tris 1 M (pH 6,8)					1,0
Tris 1,5 M (pH 8,8)	6,3	6,3	6,3	6,3	
SDS (10 %)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,08
APS (10 %)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,08
TEMED	0,01	0,01	0,015	0,02	0,008
Gesamtvolumen	25	25	25	25	8

Tabelle 2.3: SDS-PAGE Zusammensetzung

Probenvorbereitung:

Alle Proben wurden in Lämmli-Puffer für 8 min auf 95°C erhitzt.

3x Lämmli-Puffer:

6 % (w/v) SDS
 30 % (w/v) Glycerin
 150 mM Tris-HCl, pH 6,8
 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
 150 mM DTT

Elektrophorese:

Als Laufpuffer wurde 1x Elektrophoresepuffer verwendet. Für das Durchlaufen des Sammelgels wurden 80 V Spannung für ca. 30 min angelegt. Im Trenngel dann für ca. 2 h 180 V. Der Proteinstandardmarker "*Precision Plus Protein Prestained Standard (Dual Color)*" (BioRad) diene als Molekulargewichts-Referenz.

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris
190 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

2.2.2 Western-Blot

In SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine lassen sich durch Elektrotransfer auf Nitrocellulose-Membranen, die Proteine binden können, übertragen (*blotten*). Dazu legt man Gel und Membran aufeinander und legt eine Spannung so an, dass die negativ aufgeladenen Proteine in die Membran wandern. Anschließend wird die Membran mit einer Milchpulver-Lösung „geblockt“. So werden alle nicht besetzten Proteinbindungsstellen besetzt, bevor man mit Antikörpern inkubiert. Diese binden dann tatsächlich nur das zu detektierende Protein und nicht die Membran. Es wird also zunächst mit dem Erstantikörper inkubiert, der an das *protein of interest* bindet. Anschließend wird die Membran mit PBS gewaschen und der Zweitantikörper, welcher mit dem Ersten interagiert, darauf gegeben. Der an das Enzym *Horse-Raddish-Peroxidase* (HRP) gekoppelte Zweitantikörper wird dann in einer Chemielumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Dies geschieht, indem man den Blot mit Luminol, dem Substrat der HRP benetzt.

Alle Proteine wurden in einem Semi-Dry-Blotting-Apparat in einer Stunde bei 12 V und 400 mA auf eine PROTRAN-Nitrocellulose-Membran (Whatman) geblottet. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Anode / zwei Lagen Whatman-Papier / Nitrocellulose-Membran / Gel / zwei Lagen Whatman-Papier / Kathode. Dabei wurden alle Papiere und die Membran in Western-Blot-Puffer getränkt. Dann wurde für 1 h in 100 ml einer 5 %igen Milchpulver-Lösung (in PBS; 0,1 % Tween) geblockt. Zum Nachweis der Proteine wurden die folgenden Antikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

Erstantikörper	Distributor	Spezies		Verdünnung (in 2 ml PBS)
α - β -Actin	Cell Signaling, Danvers, USA	Hase	polyklonal	1:500
α -E-Cadherin	BD	Maus	monoklonal	1:1000
α - β -Catenin	SIGMA, St. Louis, USA	Hase	polyklonal	1:1000
α -GAPDH	Stressgen, Hamburg	Maus	monoklonal	1:200
α -Galectin-3	H.P. Elsässer, Marburg	Hase	polyklonal	1:1000
α -GFP, full-length	Clontech, Mountain View, USA	Hase	polyklonal	1:500
α -GP114	A. Le Bivic, Marseille, Frankreich	Hase	polyklonal	1:2000
α -GP114	K. Simons, Dresden	Maus	monoklonal	1:1000
α -Mx1 (M143)	G. Kochs, Freiburg	Maus	monoklonal	1:1000
α -Mx1	PTG, Proteintech Group, Chicago, USA	Hase	polyklonal	1:500
α -P75	A. Le Bivic, Marseille, Frankreich	Maus	monoklonal	1:500
α - α -Tubulin	SIGMA, St. Louis, USA	Maus	monoklonal	1:500

Tabelle 2.4: Antikörper für Western-Blots

Die Inkubation der Membranen mit den Erstantikörpern erfolgte ü.N. bei 4°C oder für 1 h bei RT. Die mit den Zweitantikörpern für jeweils eine Stunde bei RT. Die Membranen wurden dazu auf einen Schüttler geklebt. Dazwischen wurde dreimal in PBS gewaschen.

Monoklonale Antikörper wurden mit einem α -Maus-HRP-Antikörper, polyklonale mit einem α -Hase-HRP-Antikörper (BioRad) im Chemielumineszenz-Verfahren (Signal Plus, Pierce) nachgewiesen. Als Substrat für die Reaktion diente Luminol welches 1:2 mit einem Reaktionspuffer vermischt wurde (je 100 μ l).

Semidry-Blotpuffer:

48 mM Tris/HCl
 39 mM Glycin
 0,04 % (w/v) SDS
 20 % (v/v) Methanol

2.2.3 TCA-Fällung

Proteine wurden mit 30 % oder 60 % Trichlor-Essigsäure (TCA; 10 % Endkonzentration) gefällt. Dazu wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen TCA versetzt, 5 min bei RT geschüttelt und anschließend für 30 min bei RT inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden für 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Die verbliebene TCA wurde in zwei aufeinander folgenden Aceton-Waschschritten entfernt. Hierfür wurde das Pellet mit jeweils 500 μ l Aceton versetzt, für 5 min bei RT geschüttelt und anschließend für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden bei RT im Abzug für ca. 30 min getrocknet und in 30 μ l Lämmli-Puffer (3x) aufgenommen.

2.3 Co-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) kann man Interaktionen zwischen Proteinen qualitativ und quantitativ nachweisen. Dieser Technik liegt folgendes Prinzip zu Grunde: Protein A ist ein Protein aus dem Bakterium *S. aureus*, welches Antikörper (IgG) reversibel über ihre Fc-Domäne bindet. Koppelt man Protein A an Sepharose-Kügelchen, so lassen sich alle Antikörper und daran assoziierte Proteine durch Zentrifugation pelletieren.

Als Ausgangsmaterial dienten voll auspolarierte MDCK-Zellen, die bei 37°C und 5 % CO₂ in Petrischalen (10 cm) gewachsen waren. Um die Aktivität von Proteasen herabzusetzen, wurde das gesamte Experiment auf Eis (4°C) durchgeführt.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 300 µl Standardlysispuffer pro Schale aufgenommen. Außerdem wurden 10 µl Protease-Inhibitoren-Mix pro Schale zugegeben. Diese Zellsuspension wurde zur Lyse in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 Stunde bei 4°C geschwenkt. Nach dem Zentrifugieren der Proben für 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand für 1 h mit 30 µl Protein A-Sepharose (PAS) inkubiert. Das bei 2000 rpm sedimentierende Pellet wurde verworfen. Durch dieses *Preclearing* sollten alle Proteine, die von sich aus an PAS binden und somit für ein falsch positives Ergebnis sorgen würden, entfernt werden. Mit dem Überstand wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden 0,3 µl des jeweils angegebenen Antikörpers zum Überstand gegeben und für 1 h schwenkend inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl PAS für eine weitere Stunde wurden die PAS/Antikörper/Protein-Komplexe bei 2000 rpm für 1 min pelletiert. Dieses Pellet wurde zweimal mit 500 µl PBS (0,1 % NP-40) und zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend in 20 µl Lämmli-Puffer (3x) aufgenommen. Dann wurden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western-Blot nachgewiesen.

Standardlysispuffer:

25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
50 mM NaCl
0,5 % Natriumdeoxycholat
0,5 % Triton-X-100

2.4 Oberflächen-Immunopräzipitation

Um den Einfluss eines Proteins auf den apikalen Sortierapparat untersuchen zu können, kontrolliert man mittels einer Oberflächen-IP, ob bestimmte apikale Markerproteine durch den *knock-down* des entsprechenden Proteins in deren Verteilungsverhalten auf die apikale Zytoplasmamembran gestört werden. In diesem Experiment werden alle Proteine radioaktiv markiert, indem man der Zelle Methionin zufügt, in dem das radioaktive Isotop S^{35} eingebaut wurde. Apikale Proteine gelangen an die apikale Zytoplasmamembran und werden dort durch die Zugabe eines entsprechenden Antikörpers von diesem gebunden. Anschließend werden die Zellen lysiert und die Protein-Antikörperkomplexe mittels Protein-A-Sepharose präzipitiert (vgl. Co-IP), in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Phospho-Imager* sichtbar gemacht. So erhält man einen quantifizierbaren Eindruck darüber, welche Menge des apikalen Markerproteins noch an seinen Bestimmungsort gelangt. Durch die Zugabe des Antikörpers zum verbliebenen Zelllysate kann man herausfinden, ob das apikale Markerprotein im Zytosol verblieben ist. Gibt man den Antikörper auf die basale Zytoplasmamembran, kann man feststellen, ob das apikale Markerprotein fehlsortiert wurde. Die differenzierte Zugabe des Antikörpers wird durch die Kultivierung der Zellen auf PET-Filtern ermöglicht.

Zunächst wurden die Zellen dünn auf 6 Well PET-Filter ausgesät und am darauf folgenden Tag und am 4. Tag nach Aussaat mit siRNA transfiziert. Am 6. Tag wurde die Oberflächen-IP durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1 h lang mit Methionin freiem Medium (MEM) inkubiert. Diese Methionin-Depletion sorgte dafür, dass ein Großteil des in der Zelle vorhandenen Methionins aufgebraucht wurde. Im nächsten Schritt wurde mit dem radioaktiven Schwefel-Isotop S^{35} markiertes Methionin (60 μ Ci/Filter) für 2 h auf die Zellen gegeben (*Pulse*). Somit wurde in alle neu synthetisierten Proteine S^{35} Methionin eingebaut. Darauf folgte eine 4 bzw. 6stündige Inkubation der Zellen in herkömmlichem MEM (+Methionin). Während dieser Zeit wurden die apikalen Markerproteine, je nach Einfluss der transfizierten siRNA, in die apikale Zytoplasmamembran transportiert. Dann wurden die für das jeweilige apikale Markerprotein spezifischen Antikörper für 2 h auf die apikale oder basale Oberfläche gegeben (s. Tabelle). Ab diesem Zeitpunkt folgten alle Inkubationen bei 4°C. Danach wurde fünfmal mit PBS (0,1 % BSA) und zweimal mit PBS gewaschen. Pro Filter wurden dann 800 μ l Lysispuffer (+10 μ l PI/ml) auf die Zellen gegeben und für 20 min stehen gelassen. Die Zellen wurden abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zellkerne und Debris wurden bei 13000 rpm für 30 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß pipettiert und für ca. 14 h mit 70 μ l PAS geschwenkt. Die mit Antikörper-Antigen-Komplex beladenen Sepharose-Beads wurden für 1 min bei 5000rpm

abzentrifugiert, zweimal mit 300 µl Waschpuffer 1 und zweimal mit 500 µl Waschpuffer 2 gewaschen und in 25 µl Lämmli-Puffer (3x) aufgenommen. Der aus dem vor dem Waschen erfolgten Zentrifugationsschritt hervorgegangene Überstand enthielt das Zelllysate. Mit diesem wurde eine weitere IP mit dem jeweils gleichen Antikörper durchgeführt. Auch diese Sepharose-Beads wurden wie oben beschrieben gewaschen und in 25 µl Lämmli-Puffer (3x) aufgenommen. Anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, das Gel getrocknet und in einer Metallkassette mit einem *Phospho-Imager-Screen* bedeckt. Dieser wurde nach ca. 4 Tagen im *Phospho-Imager* analysiert.

apikales Markerprotein	Antikörper	Volumen (apikal oder basal)	Volumen (Lysat)
P75-GFP	ME 20.4	1 µl	0,3 µl

Tabelle 2.5: Antikörper für Oberflächen-Immunopräzipitation

Lysispuffer (pH 8,0):

Tris	25 mM	1,51 g
NaCl	50 mM	1,46
Na-Desoxycholat	0,5 %	2,5 g
Triton X-100	0,5 %	2,5 g
dH ₂ O		ad 500 ml
		pH-Wert einstellen

Waschpuffer I:

Triton X-100	0,5 %	2,5 g
Na-Desoxycholat	0,005 %	250 mg
		ad 500 ml PBS

Waschpuffer II (pH 8,0):

NaCl	500 mM	14,61 g
Tris	125 mM	7,56 g
EDTA	10 mM	1,86 g
Triton X-100	0,5 %	2,5 g
		ad 500 ml dH ₂ O
		pH-Wert einstellen

2.5 Membranaufreinigung

Um der Frage nachzugehen, ob Mx1 ein Membran assoziiertes Protein ist, wurden Membranen aus MDCK-Zellen aufgereinigt. Eine etablierte Methode, Zellen in ihre Bestandteile aufzutrennen ist, sie aufzuschälen und die Bruchstücke gemäß ihrer Dichte in einer Dichtegradienten-Zentrifugation voneinander zu trennen. Teile mit höherer Dichte – wie z.B. Organelle und Zellkerne – werden sich dabei im unteren Bereich des Gradienten ansammeln, Teile mit geringerer Dichte im oberen Bereich. Trägt man die zerstörten Zellen auf den Boden eines solchen Gradienten auf, so werden die Membranen (Plasmamembran, ER-Membran, Golgi-Membran, Vesikel-Membranen) im Laufe der Zentrifugation nach oben schwimmen („floaten“). Handelt es sich dabei um einen nicht linearen Gradienten, so sammeln sich alle Membranfragmente an der Phasengrenze zu der Phase, die sie auf Grund ihrer dafür zu hohen Dichte nicht mehr passieren können.

Als Gradienten-Lösung wurde Iodixanol (Produktname: Nycodenz von Axis-Shield, Oslo) verwendet. Das gesamte Experiment wurde auf Eis (4°C) durchgeführt. Außerdem wurden alle verwendeten Lösungen mit 10 µl Protease-Inhibitoren-Mix pro 1 ml Lösung versetzt. Pro Membran-Präparierung wurden 6 Schalen (10 cm) voll auspolarisierter Zellen eingesetzt. Diese wurden dann zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS pro Schale aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Zellen wurden in einem 5minütigen Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm pelletiert, in 1 ml Nycodenz (5%) aufgenommen und wie folgt aufgeschlossen:

- 20 Mal in eine blaue Mikropipetten-Spitze aufsaugen (→Zellen lösen sich voneinander)
- 30 Mal in eine 1 ml Spritze mit 26G-Kanüle aufsaugen (→Plasmamembran wird zerstört)
- 10 Mal im Dounce-Homogenisator aufscheren (→Plasmamembran wird zerstört)

Diese Suspension wurde für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. So trennten sich intakte Zellen, Zellkerne und Zelldebris vom sogenannten postnukleären Überstand (PNS), welcher dann in die 60 %-Fraktion eines nichtlinearen Nycodenz-Gradienten gemixt wurde (s. u.), mit dessen Hilfe die Membranfragmente weiter von z.B. Mitochondrien, Peroxisomen, restlichen Zellkernen usw. getrennt werden sollten.

Dieser Gradient wurde für 20 Stunden bei 38000 rpm und 4°C im Vakuum in einer Ultra-Zentrifuge zentrifugiert. Die Membranfraktion in der Interphase zwischen Nycodenz (30 %) und Nycodenz (20 %) wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette (ca. 1 ml) abgenommen und nach dem Vermischen mit 10 ml HEPES (10 mM) für 2 Stunden bei 38000 rpm, 4°C im Vakuum pelletiert. Das Pellet wurde

anschließend in Lämmli-Puffer (3x) aufgenommen und in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot analysiert.

10 mM HEPES: (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure) (pH 7,4)

Nycodenz (60 %): 60g Nycodenz mit H₂O_{dd} auf 100 ml aufgefüllt

Nycodenz (30 %): Nycodenz (60 %) in HEPES (pH7,4) verdünnt

2.6 TGN-Exit-Experimente

Proteine im klassischen sekretorischen Weg können während ihres Transports durch ER und Golgi-Apparat in diesen Kompartimenten aufgehalten werden (Ladinsky et al., 2002). Bei 15°C funktioniert der Proteintransport zwischen *cis*- und *trans*-Golgi-Kompartiment nicht mehr. So sammeln sich alle Proteine im *cis*-Golgi-Netzwerk. Bei 20°C bleiben die Proteine im *trans*-Golgi-Netzwerk „hängen“ (TGN-Block). Durch die Zugabe des Protein-Biosynthese-Hemmers Cycloheximid in das Kulturmedium nach ca. 2 h TGN-Block verhindert man die Synthese von neuen Proteinen und alle bis zu diesem Zeitpunkt synthetisierten sammeln sich im TGN. Kultiviert man diese synchronisierten Zellen darauf wieder bei 37°C, so werden alle Proteine wieder aus dem blockierten Kompartiment entlassen. Auf diese Art und Weise kann man z.B. die Zeit messen, die ein Protein braucht, um zur Plasmamembran transportiert zu werden, wann zwei Proteine nach dem Verlassen des TGN miteinander interagieren oder wie sich die Proteinzusammensetzung sekretorischer Vesikel auf dem Weg zur Zytoplasmamembran ändert.

Hierfür wurden voll auspolarisierten Zellen für vier Stunden bei 20°C und 5 % CO₂ inkubiert. In den letzten beiden Stunden wurde das herkömmliche Medium gegen Medium mit Cycloheximid (100µg/ml) ausgetauscht. Für den TGN-Release wurden die Zellen dann wieder für 0, 1, 5, 10, 20, 30, 45 oder 60 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Pro Zeitpunkt wurden je 6 Platten (10 cm) Zellen benutzt, um damit eine Vesikel-Immunpräzipitation durchzuführen.

2.7 Vesikel-Immunopräzipitation

Mittels der Vesikel-Immunopräzipitation kann man Vesikel, die ein bestimmtes Antigen tragen aus der Gesamtpopulation isolieren. Zunächst führt man dazu eine Gesamt-Vesikelaufreinigung durch. Hierfür schließt man die Zellen mechanisch auf und trägt das erhaltene Zell-Lysat auf einen Saccharose-Stufengradienten auf. Nach Ultrazentrifugation liegen die einzelnen Zellfraktionen in definierten Regionen des Stufengradienten vor. Die durch ihren hohen Lipid-Anteil leichten Vesikel sind in der oberen Hälfte vorzufinden.

Alle Arbeitsschritte erfolgten aus Schutz vor Abbau durch Proteasen bei 4°C. Die einem TGN-Exit unterzogenen Zellen wurden nun zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS (+Protease-Inhibitoren 10 µl/ml) abgekratzt und aufgenommen und anschließend für 5 min bei 800 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml HB-T-Puffer (+PI 10 µl/ml) resuspendiert. Die Zellen wurden durch 15 Mal aufsaugen durch eine 23G-Kanüle in eine 1 ml Spritze aufgeschlossen. Zellkerne wurden durch eine Zentrifugation des Zell-Lysates für 5 min bei 13000 rpm und 4°C entfernt, der Überstand auf die oben gezeigten Stufengradienten aufgetragen. Dieser wurde durch vorsichtiges Übereinanderschichten der oben angegebenen Saccharose-Lösungen (in 1 mM Mg-Acetat/10 mM Tris-HCl, pH 7,4) mittels Glaspipette erstellt. Nach 2,5 h Zentrifugation bei 36000 rpm und 4°C sammelten sich die Vesikel mit der favorisierten Größe in der Interphase zwischen 1,3 M und 0,8 M Saccharose-Fraktion. Der Gradient wurde dann mit einer Peristaltik-Pumpe von oben in 1 ml- Fraktionen separiert. Die obere Fraktion wurde verworfen. Mit den Fraktionen 2 bis 5 wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Zunächst wurde jede Fraktion nochmals mit Protease-Inhibitoren versetzt (10 µl/ml). Daraufhin wurden pro Fraktion 30 µl Protein-A-Sepharose-Beads (PAS) zugegeben, für 1 h geschwenkt und für 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Im erhaltenen Pellet sammelten sich PAS-Beads und unspezifisch daran gebundene Proteine. Der Überstand wurde über Nacht mit 0,3 µl des entsprechenden Antikörpers inkubiert. Im Fall von MDCK_{P75-GFP}-Zellen wurde mit einem polyklonalen α-GFP-Antikörper „gefischt“. Dieser konnte dann an das in der zytoplasmatischen Domäne von P75 sitzenden GFP binden und damit P75-GFP positive Vesikel an die PAS-Beads assoziieren, die im Anschluss an die Antikörper-Inkubation für 2 h in die Fraktionen gegeben wurden. Die so erhaltenen Komplexe aus PAS-Beads, α-GFP-Antikörper und daran gebundene P75-Vesikel wurden für 2 min bei 2000 rpm pelletiert, sechsmal mit HB-T-Puffer gewaschen und in HB-T-Puffer eingefroren. Mit den so erhaltenen P75-Vesikeln wurden dann entweder 2D-Gele mit anschließender MALDI-TOF-Analyse durchgeführt oder sie wurden im Western-Blot untersucht.

HB-T Puffer :

Triethanolamin	10mM
EDTA	1mM
Saccharose	250mM
mit Essigsäure pH 7,4 einstellen	

2.8 2D-Gelelektrophorese

In der 2D-Gelelektrophorese spielen zwei verschiedene Determinanten von Proteinen eine Rolle. Zum einen handelt es sich dabei um den Isoelektrischen Punkt und zum anderen um das Molekulargewicht. In diesem Verfahren werden Proteine nach beiden Eigenschaften voneinander getrennt. Auf diese Weise erhält man ein verbessertes Auflösungsvermögen im Vergleich zur klassischen eindimensionalen SDS-PAGE, in der man ausschließlich das Molekulargewicht betrachtet. In der sogenannten 1. Dimension werden Proteine nach Denaturierung durch Harnstoff im elektrischen Feld in einem immobilisierten pH-Gradienten aufgetrennt. Membranproteine werden durch den Einsatz geeigneter nicht-ionischer Detergenzien wie ASB-14 und CHAPS solubilisiert. Jedes Protein wandert dabei in den pH-Bereich, der seinem Isoelektrischen Punkt entspricht. Es trägt daraufhin keine Netto-Ladung mehr und kann nicht mehr im elektrischen Feld wandern. Im Gegensatz zur sogenannten 2. Dimension wird hier auf den Einsatz eines denaturierenden Ladungsträgers wie SDS verzichtet, der die Separierung der Proteine nach ihrer Eigenladung, die am Isoelektrischen Punkt gleich Null ist, verhindern würde.

Für die 2. Dimension werden die Proteine dann mit SDS behandelt. Dieses lagert sich zu einem zum Molekulargewicht des Proteins proportionalen Anteil an und gibt ihm eine entsprechend große negative Ladung. Außerdem werden Disulfid-Brücken durch den Einsatz von DTT geöffnet. Iodacetamid verhindert durch Acetylierung der frei gewordenen Cysteine deren Neubildung. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung werden die Proteine nun nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt (vgl. SDS-PAGE). Die so erhaltenen Gele können mit verschiedenen Färbetechniken behandelt und in der Massenspektrometrie untersucht werden.

2.8.1 Erste Dimension: Die isoelektrische Fokussierung

Für die Auftrennung der Proteine in der 1. Dimension, sprich nach ihrem Isoelektrischen Punkt, wurden die Vesikelpräparationen aus je 48 Platten (10 cm) in 600 µl Rehydrierungs-Lösung durch 30 min schwenken bei 4°C gelöst. Anschließend wurden die nun leeren PAS-Beads für 5 min bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Proteine enthaltende Überstand wurde in die 1D-Equilibrationsskammer pipettiert und mit einem auf einem Plastikstreifen immobilisierten pH-Gradientengel (GE Healthcare, Immobiline DryStrip pH 3-10, 18 cm) bedeckt. Dann wurde beides mit PlusOne DryStrip Cover Fluid (Amersham) bedeckt, um ein austrocknen der Probe zu verhindern. Im Anschluss wurde das Gel für 2 h bei 20°C mit der Probe equilibriert, danach folgte die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld durch das Anlegen einer Spannung (20°C) nach folgendem Schema:

Spannung (V)	Dauer (h)
50	10
150	1
300	2
1000	6
8000	5

Tabelle 2.6: Programm für die isoelektrische Fokussierung

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde der 1D-Streifen bei -20°C gelagert. Vor dem Auftragen auf das Gel für die 2. Dimension wurde der 1D-Streifen zunächst wieder aufgetaut und durch sukzessive Behandlung mit DTT, Jodacetamid und SDS für die Auftrennung der enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht vorbereitet. Hierfür wurde der Streifen für 15 min in einer DTT-Lösung geschwenkt, danach für 20 min in einer Jodacetamid-Lösung und zuletzt für 20 min in einer SDS-Lösung. Zwischen den beiden letzten Schritten wurde der Streifen durch Auflegen eines mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{ad}}$ ^{iniet.} getränkten Whatman-Papieres von verbliebener *Cover Fluid* gesäubert. Als Inkubationsgefäß für diese Equilibrierungsschritte diente ein PYREX-Kulturröhrchen (Größe 20).

DTT-Lösung:

Equilibrierungs-Puffer	10 ml
DTT	100 mg

Jodacetamid-Lösung:

Equilibrierungs-Puffer	10 ml
Jodacetamid	160 mg
Bromphenol Blau	6,25 µl/ml

SDS-Lösung:

Laufpuffer (1x)	10 ml
SDS	300 mg
Bromphenol-Blau	6,25 µl/ml

2.8.2 Zweite Dimension: Das SDS-Gradientengel

Auf die Auftrennung der Proteine nach ihrem Isoelektrischen Punkt folgte die Auftrennung nach deren Molekulargewicht in einem modifizierten SDS-Polyacrylamidgel. Um ein möglichst breites Molekulargewichtsspektrum abzudecken wurden Gradientengele verwendet, deren Polyacrylamid-Konzentration zwischen 6 und 16 % lag. Jedes Gel setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Trenngel (6 %)	Trenngel (16 %)
	Volumen (ml)	Volumen (ml)
dH ₂ O	11	0
Laufpuffer (4x)	5	5
Acrylamid-PDA-Lösung (30,8 %)	3,9	10,4
Glycerin	0	4,5
SDS (10 %)	0,198	0,198
APS (10 %)	0,109	0,074
TEMED	0,012	0,010
Gesamtvolumen	ca. 20	ca. 20

Tabelle 2.7: 2D SDS-PAGE Zusammensetzung

Diese wurden getrennt voneinander zusammenpipettiert und mit Hilfe eines Gradientenmixers zu einem Gradientengel vereinigt.

Der wie in Schritt a) behandelte 1D-Streifen wurde nun vorsichtig auf das vorbereitete Gel geschoben und mit warmer Agarose-Lösung bedeckt. Um eine Tasche für den Protein-Standard-Marker zu schaffen, wurde am Rand des Gels ein Plastikstückchen eingelassen. Nach Aushärten der Agarose für 20 min bei 4°C wurde der Protein-Standard-Marker zugegeben und der Gel-Lauf gestartet. Zunächst wurde für 2 h eine Spannung von 20 V angelegt, danach für 18 h 100 V. Alle Gele wurden im Folgenden mit Coomassie-Blau und Silber gefärbt.

1D-Puffer:

Harnstoff	7M	6,25 g
Thio-Harnstoff	2M	1,9 g
ASB 14	2 %	250 mg
CHAPS	4 %	500 mg
H ₂ O ad inject.		auf 12,5 ml auffüllen

Rehydrierungs-Lösung:

1D-Puffer		1 ml
Ampholyte	0.5 % (max)	4.8 µl/ml
DTT	0.28 %	2.8 mg/ml
BBP	0.2 %	6.25 µl/ml

Tris-Lösung (50 ml):

Tris	50 mM	0,303 g
H ₂ O ad inject.		
pH 8,8 einstellen		

Laufpuffer (1l):

Tris	25 mM	3,029 g
Glyzin	0,192 mM	14,42 g
SDS	0,1 %	1 g
Natrium-Thiosulfat	5 mM	1,24 g
dH ₂ O		

Equilibrierungs-Puffer:

Harnstoff	6 M	7,2 g
Glycerol		6 ml
SDS		300 mg
H ₂ O ad inject..		6,7 ml
Tris (pH 8.8)		2 ml (aus 50 ml)

Agarose-Lösung:

Laufpuffer (1x)	40 ml
Agarose (low melting)	0,4 g

Acrylamid-PDA-Lösung (100ml):

Acrylamid (40 %)	30 %	75 ml
PDA		0,8g
H ₂ O ad inject.		25 ml
→ Aluminiumfolie, 4°C		

2.9 Coomassie-Färbung

Alle 2D-Gele wurden zunächst mit Coomassie-Blau gefärbt. Im Anschluss wurde eine Silber-Färbung durchgeführt. Diese zweifache Färbung stellte sich als sensitiver als eine alleinige Silber-Färbung heraus.

Die Proteine wurden durch eine zweimalige einstündige Inkubation in der Fixierlösung im Gel fixiert. Daraufhin wurden die Gele für dreimal dreißig Minuten mit Wasser gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation in der Färbelösung. Nach einer Stunde wurden 100 mg Kolloidal Blau (G250) zur Lösung gegeben und für 24 h geschüttelt. Der blaue Farbstoff bindet dabei an basische und aromatische Aminosäurereste.

Fixierlösung (300 ml):

Ethanol	150 ml
H ₃ PO ₄ (85 %)	9 ml
dH ₂ O	143 ml

Färbelösung (300 ml):

Methanol	102 ml
Ammoniumsulfat	51 g
H ₃ PO ₄ (85 %)	6 ml
dH ₂ O	172 ml

2.10 Silber-Färbung

Im Gegensatz zum Coomassie-Gel in dem 100ng Protein pro Bande nachgewiesen werden können, erhöht sich beim Silber-Gel die Sensitivität nochmals mindestens um den Faktor 100 auf 0,1 – 1 ng/Bande. Die Färbung beruht auf der Bindung von Ag⁺-Ionen an Glu-, Asp-, und Cys-Reste der Proteine. In alkalischer Lösung reduziert Formaldehyd dann Ag⁺ zu Ag, welches als schwarzer Niederschlag sichtbar wird.

Die bereits mit Coomassie gefärbten Gele wurden dreimal 30 min mit a. dest. gewaschen und nochmals für 1 Stunde in Fixierlösung inkubiert. Darauf folgten drei aufeinander folgende 20minütige Waschschrte in der Waschlösung. Dann wurde für 2 min in einer Natriumthiosulfatlösung inkubiert und dreimal 3 Minuten in a. dest. gewaschen. Als nächstes wurden die Gele für 20-30 min in der

Silberlösung geschwenkt und daraufhin zweimal in a. dest. gewaschen. Nach ca. 5 Minuten in der Entwicklerlösung wurde die Färbung durch 30minütige Behandlung mit der Stopplösung beendet. Die gefärbten Gele wurden dann entweder in a. dest. aufbewahrt oder in festen DIN A4 Plastiktaschen verschweißt.

Fixierlösung:

Methanol	50 %	125 ml
Essigsäure	12 %	30 ml
Formaldehyd	0,05 %	125 µl
dH ₂ O		95 ml

Waschlösung:

Methanol	50 %	375 ml
dH ₂ O		375 ml

Natriumthiosulfatlösung:

Natriumthiosulfat (10 %)	0,02 %	500 µl
dH ₂ O		250 ml

Silberlösung:

Silbernitrat	0,2 %	1 g
Formaldehyd	0,076 %	125 µl
dH ₂ O		500 ml
Lagerung bei 4°C		

Entwicklerlösung:

Kaliumcarbonat	6 %	15 g
Natriumthiosulfat (10 %)	0,00004 %	31,25 µl
Formaldehyd	0,05 %	125 µl
dH ₂ O		250 ml

Stopplösung:

Methanol	50 %	125 ml
Essigsäure	12 %	30 ml
dH ₂ O		125 ml

2.11 Massenspektrometrie: MALDI-TOF

Das Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight Verfahren (MALDI-TOF) ist eine spezielle Art von Massenspektroskopie, mit der man u. a. unbekannte Proteine identifizieren kann. Grundlegendes Prinzip ist hierbei die Ionisierung von Protease verdauten Peptiden und deren unterschiedliche Flug-Geschwindigkeit durch ein elektrisches Feld.

Für die Analyse von Proteinen in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer müssen diese zunächst durch eine Protease geschnitten werden. Häufig wird hierfür Trypsin verwendet. Dieses spaltet Proteine C-terminal an Lysin- oder Arginin-Resten (bei einem C-terminal zur Schnittstelle gelegenen Prolin erfolgt keine Spaltung). Durch diesen Verdau entsteht ein für jedes Protein charakteristisches Muster von Peptidfragmenten definierter Größe. Findet die Proteinspaltung im zuvor durchgeführten 2D-Gel statt, so spricht man vom In-Gel-Verdau. Nach diesem Schritt müssen die Proteine aus dem Gel in Lösung gebracht werden. Hierzu dienen die Extraktionsmittel Trifluoressigsäure und Acetonitril. Wobei Acetonitril das Anhaften von Proteinen an Reaktionsgefäße verringern soll. Die beiden Chemikalien werden nach der Extraktion in einer Vakuumzentrifuge wieder entfernt. Für die Analyse im Massenspektrometer müssen die Proteine dann auf einen Probenträger (*Target*) aufgebracht werden. Dazu dient eine stabile Stahlplatte. Für das Auftragen auf das Target werden spezielle Pipettenspitzen (ZipTips) benutzt. In diesen befindet sich eine poröse Protein bindende Substanz, in der die Peptide aufgenommen werden und mit der sog. **Matrix** (α -Cyano-4-hydroxymizinsäure) in Kontakt kommen. Beides zusammen wird auf das Target pipettiert. Dort kommt es zur Kokristallisierung von Matrix und Peptiden. Diese Verfahren nennt man *Dried-Droplet*-Verfahren. Im Spektrometer wird nun das Kokristallat mit einem **Laser** beschossen, dessen Wellenlänge stark von der Matrix absorbiert wird. Dabei wird soviel Energie frei, dass sich Peptide und Matrix gemeinsam explosionsartig vom Target ablösen (**Desorption**). Gleichzeitig findet hierbei die **Ionisierung** der Peptide statt, die daraufhin im elektrischen Feld (Vakuum) beschleunigt werden. Alle Peptide tragen dabei eine zu ihrem Molekulargewicht proportionale positive Ladung. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ladung brauchen große Peptide länger als kleine, um das elektrische Feld zu durchqueren und werden erst später am Detektor ankommen. Sie benötigen also eine längere Flugzeit (**Time Of Flight**). Diese Flugzeit (*tof*) ist proportional zur Wurzel des Quotienten aus der Masse des Peptides (*m*) und dessen Ladungszahl (*z*).

$$tof \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Am Detektor wird das Auftreffen der Peptide in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieses wird dann in einem Grafen abgebildet, in dem die Signalintensität gegen das Verhältnis von Masse zu Ladungszahl ($\frac{m}{z}$) aufgetragen wird. So entsteht ein für jedes einzelne Protein charakteristisches Bild von Peptidmassen, welches mit dem einer theoretischen Enzymbehandlung abgeglichen werden kann.

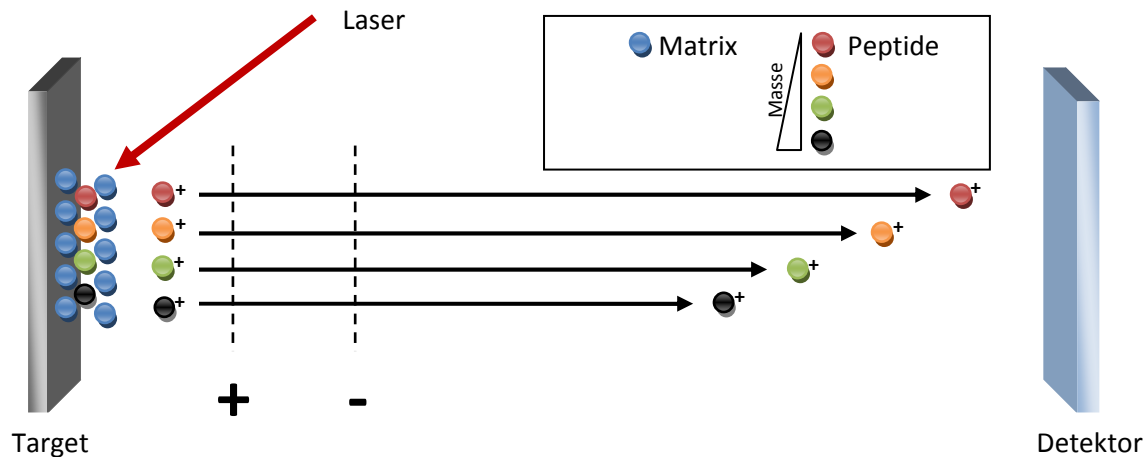


Abbildung 2.3: Prinzip der MALDI-TOF Massenspektrometrie

2.11.1 Entfärbung

Um die Verunreinigung der Proteinproben mit Proteinen aus der Umwelt zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte zur MALDI-TOF-Analyse mit Handschuhen durchgeführt. Es wurden außerdem separate, nicht autoklavierte Pipettenspitzen und Eppendorf-Reaktionsgefäße benutzt. Alle Laborutensilien wurden vor Gebrauch mit Alkohol (70 %) gesäubert.

Vor der Analyse im Massenspektrometer wurden die Protein-Spots mit einem Skalpell aus dem 2D-Gel geschnitten und in separate Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. In diesen wurde die anschließende Entfärbung durchgeführt, da entfärbte Peptide ein besseres Ergebnis in der MALDI-TOF-Analyse liefern. Die Entfärbelösung wurde aus je einem Teil Kaliumferrocyanid (30 mM) und einem Teil Natriumthiosulfat (100 mM) hergestellt. 50 µl dieser Flüssigkeit wurden auf jeden Protein-Spot gegeben, gevortext und solange inkubiert, bis die schwarze Silberfärbung nicht mehr zu sehen war. Darauf wurde dreimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{ad iniekt.}}$ gewaschen und für 20 min mit Ammoniumbicarbonat (50 mM) inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift in $\text{H}_2\text{O}_{\text{ad iniekt.}}$ und mehrere Inkubationsschritte in Acetonitril (50 %) bis die Protein-Spots eine weißliche Trübung zeigten. Als nächstes wurden die

entfärbten Gelstückchen im geöffneten Reaktionsgefäß in einen Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, feucht) 1 bis 2 h getrocknet, bis sie nicht mehr am Reaktionsgefäß kleben blieben.

2.11.2 Trypsin-Behandlung („In-Gel-Verdau“)

Die Proteine in den getrockneten Gelstückchen wurden anschließend mit Trypsin geschnitten. Die Trypsinlösung setzte sich dabei wie folgt zusammen: Jedes µg Trypsin (Promega Gold) wurde in 1 µl Essigsäure (50 mM) gelöst. 1 µl dieser Trypsin/Essigsäure-Lösung wurde dann in 100 µl Ammoniumbicarbonat (50 mM) aufgenommen. 10 µl der Trypsin-Lösung wurden über Nacht bei 37°C auf jeden Protein-Spot gegeben. Danach wurde überschüssige Trypsinlösung entfernt und die entstandenen Peptide aus dem Gel gelöst. Hierzu diente die aufeinanderfolgende 30minütige Inkubation der Gel-Stückchen mit zunächst 25 µl dann 10 µl der Extraktionslösung (0,1 % Trifluoressigsäure, 50 % Acetonitril). Somit entstanden 35 µl Proteinextrakt pro Gel-Stückchen. Dieses wurde durch einen ca. 15-30minütigen Zentrifugationsschritt in einer Vakuumzentrifuge auf ca. 15 µl eingengt. Außerdem wurden so Trifluoressigsäure und Acetonitril aus der Lösung entfernt.

2.11.3 Auftrag auf das MALDI-Target

Im letzten Präparationsschritt wurden die Peptide mit der Matrix auf das MALDI-Target aufgebracht. Hierfür wurden spezielle Spitzen verwendet (ZipTips, Millipore). Diese wurden zunächst durch Auf- und Abpipettieren dreimal mit Acetonitril (50 %) und dreimal mit Trifluoressigsäure (0,1 %) inkubiert. Daraufhin wurde zehnmal die Peptidlösung auf- und abpipettiert. So wurden die Peptide an das in den ZipTips befindliche Silikat gebunden. Danach wurde noch einmal Trifluoressigsäure auf- und abpipettiert und zum Schluss ca. 15 µl Matrix in die ZipTips aufgenommen. Dieses Gemisch wurde dann auf das MALDI-Target aufgetragen und an der Luft getrocknet.

Matrix:

α-Cyano-4-hydroxymizsäure

gesättigte Lösung in 1 ml Trifluoressigsäure (0,2 %)/Acetonitril (50 %) erstellen, abzentrifugieren und Überstand verwenden

2.11.4 MALDI-TOF Massenspektrometer

Alle massenspektrometrischen Messungen wurden an einem Ultraflex TOF/TOF MALDI Gerät (Bruker Daltonics) durchgeführt, welches mit der Bediensoftware *FlexControl* (Bruker Daltonics) gesteuert wurde. Zunächst wurde das Gerät mit einem Peptid-Standard (Peptid Kalibrierungsstandard II Bruker Daltonics) kalibriert, der zeitgleich mit den Proben auf das Target aufgebracht wurde und eine Detektionsbereich von 740 bis 4400 Da eingestellt. Für die Kalibrierung mussten mindestens 4 Peptide gefunden und abgespeichert werden. Dann wurden die Proben mehrmals mit dem Laser beschossen, die erhaltenen Spektren addiert und mit der *FlexAnalysis*-Software analysiert. Direkt im Anschluss wurde nach Übereinstimmung der erhaltenen Peptidmassen mit theoretischen Peptidmassen aus Internetdatenbanken gesucht. Als Suchmaschine dienten MASCOT Peptide Mass Fingerprint (Matrix Science), PROFOUND (Prowl, Rockefeller) oder ALDENTE (ExPASy Proteomics Server). Falls vorhanden wurde in caninen Datenbanken gesucht, wenn nicht in den übrigen Säugetier-Datenbanken.

2.12 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine Technik, mit der man Proteine im Fluoreszenzmikroskop nachweisen kann. Dafür werden Zellen oder Gewebe fixiert und die jeweiligen Proteine mit Hilfe von Antikörpern detektiert. D.h. man inkubiert die Zellen oder Gewebe mit einem Erstantikörper gegen das nachzuweisende Protein, den man anschließend wiederum mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper detektiert. Die fluoreszierenden Eigenschaften der Zweitantikörper beruhen auf deren Kopplung an einen Alexa-Farbstoff wie z.B. Alexa488, Alexa546 oder Alexa633. Diese haben verschiedene Anregungs- und Emissionsspektren (Anregungswellenlänge im Namen impliziert), weshalb man in ein und demselben Präparat zwei oder mehr Proteine gleichzeitig nachweisen kann (*Costaining*).

2.12.1 MDCK-Zellen

Die Zellen für die mikroskopische Untersuchung wurden für fünf Tage in Schalen (10 cm) auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min in 4 % PFA fixiert. Darauf folgte eine Behandlung für 20 min in PBS (0,025 % Saponin) und für 30 min in PBS (0,025 % Saponin; 1 % BSA). Dabei permeabilisiert das Detergens Saponin die Zytoplasmamembran und macht das Zellinnere für die Antikörperinkubation zugänglich. Der Erstantikörper in 50 µl PBS (0,025 % Saponin; 1 % BSA) wurde für 2 h auf die Zellen in einer Feuchtekammer gegeben. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 50 µl der Zweitantikörper-Lösung (in PBS; 0,1 % BSA) für 1 Stunde auf die Zellen gegeben und diese noch 2 weitere Male mit PBS gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurde für 10 min in Hoechst3332 (1:2000 in PBS) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Mowiol auf Objektträgern fixiert. All Färbungen mit Rab-Antikörpern wurden in Ziegenserum anstelle von BSA durchgeführt.

Erstantikörper	Distributor	Spezies		Verdünnung (in 2 ml PBS)
α - β -Catenin	BD	Maus	monoklonal	1:200
α -E-Cadherin	BD	Maus	monoklonal	1:200
α -Clathrin (hc)	BD	Maus	monoklonal	1:200
α -Dynamin-2	BD	Maus	monoklonal	1:200
α -EEA1	BD	Maus	monoklonal	1:200
α -Galectin-3	H.P. Elsässer, Marburg	Hase	polyklonal	1:50
α -LAMP2 (AC17)	A. Le Bivic, Marseille, Frankreich	Maus	monoklonal	1:200
α -Mx1 (M143)	G. Kochs, Freiburg	Maus	monoklonal	1:200
α -P75	A. Le Bivic, Marseille, Frankreich	Maus	monoklonal	1:200
α -p230	BD	Maus	monoklonal	1:100
α -Rab4	BD	Maus	monoklonal	1:100
α -Rab8	BD	Maus	monoklonal	1:100
α -Rab11	BD	Maus	monoklonal	1:100
α - α -Tubulin	Sigma	Maus	monoklonal	1:200
Zweitantikörper	Distributor	Spezies		Verdünnung (in 2 ml PBS)
α -Maus-Alexa488	Invitrogen	Ziege	polyklonal	1:200
α -Maus-Alexa546	Invitrogen	Ziege	polyklonal	1:200
α -Hase-Alexa488	Invitrogen	Ziege	polyklonal	1:200
α -Hase-Alexa546	Invitrogen	Ziege	polyklonal	1:200

Tabelle 2.8: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-Zellen

2.12.2 Mäusedarm-Gewebeschnitte

Die in Carnoy fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden vor der Immunfluoreszenz-Färbung in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, für 5 min in Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (10 mM, pH 6) gekocht und je einmal mit a. dest. und einmal mit PBS gewaschen. Zum Blockieren freier, unspezifischer Bindestellen für den Erstantikörper wurde für 45 min mit Ziegen Serum (10 %) inkubiert. Darauf folgte die einstündige Inkubation mit dem Erstantikörper und ein Waschschriff in PBS. Daraufhin wurde für 1 h mit dem jeweiligen Zweitantikörper inkubiert. Dieser wurde ebenfalls in Ziegen Serum (10 %) verdünnt. Im Anschluss wurde eine Kernfärbung mit Hoechst3332 (1:2000 in PBS) durchgeführt. Zum Schluss wurden alle Proben je einmal mit PBS und a. dest. gewaschen und in Mowiol fixiert.

Erstantikörper	Distributor	Spezies		Verdünnung (in 2 ml PBS)
α -LPH (DRBB2/33)	A.Quaroni	Maus	monoklonal	1:50
α -SI (DRBB2/158)	A.Quaroni	Maus	monoklonal	1:100
α -DPP IV (3/456/22)	A.Quaroni	Maus	monoklonal	1:100
α -E-Cadherin (Klon 36)	BD	Maus	monoklonal	1:100
Zweitantikörper	Distributor	Spezies		Verdünnung (in 2 ml PBS)
α -Maus-Alexa488	Invitrogen	Ziege	polyklonal	1:500

Tabelle 2.9: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung von Maudarmpräparaten

2.13 Mikroskopie

2.13.1 Total Internal Reflection Fluorescence-Mikroskopie (TIRFM)

Die TIRF-Mikroskopie (*Total Internal Reflection Fluorescence*) bedient sich eines optischen Phänomens auf dessen Grundlage ein nur sehr geringer Teil des zu betrachtenden Präparates illuminiert und betrachtet wird. Im Prinzip handelt es sich dabei um eine Fluoreszenz-Mikroskopie-Technik mit deren Hilfe man fluoreszierende Strukturen in nächster Nähe (bis zu ca. 300 nm) zu einer Glasfläche betrachten kann. Im Gegensatz zur Epifluoreszenz mit der das gesamte Präparat angeleuchtet und betrachtet wird, wird in der TIRF-Mikroskopie eine nur 70-300 nm dünne Schicht unterhalb des Objektträgers beleuchtet. Somit kann man Informationen über einen definierten Bereich der Zelle erhalten.

Fällt ein Lichtstrahl auf eine Glasfläche, so wird ein Teil des Lichtes reflektiert, ein anderer Teil wird an der Glasoberfläche gebrochen und passiert das Glas. Unterschreitet man dabei jedoch einen kritischen Winkel α zwischen Lichtstrahl und Glasoberfläche, so kommt es zur Total-Reflexion des Strahles. Dabei entsteht auf der gegenüberliegenden Seite der reflektierenden Glasfläche ein sogenanntes evaneszentes Feld. Dieses kann zwischen 70 und 300 nm Größe variiert werden und dient zur Anregung fluoreszierender Teilchen wie z. B. GFP. Als Lichtquelle dienen mehrere Laser mit definierter Wellenlänge. So können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe separat angeregt werden.

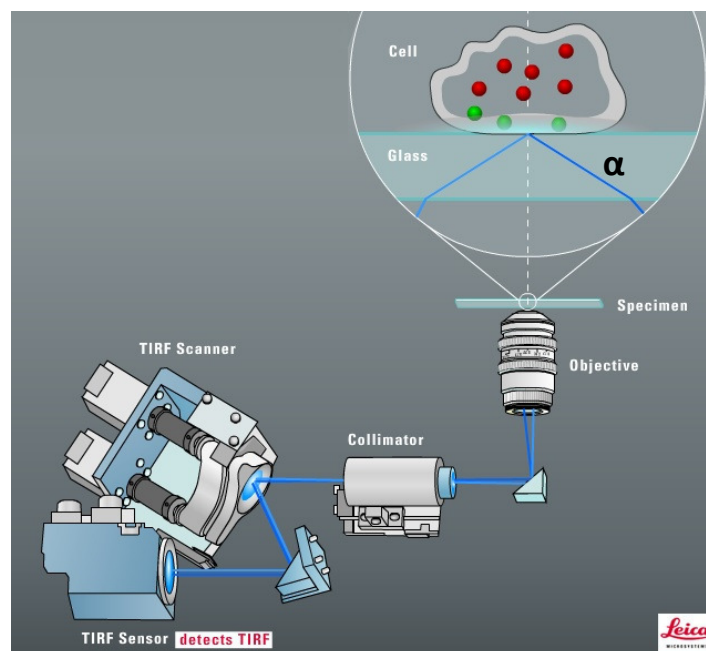


Abbildung 2.4: Prinzip der TIRF-Mikroskopie

Für die Erstellung der TIRF-Bilder wurde ein Leica TIRF-System AM TIRF MC auf Basis des DMI 6000 B Fluoreszenzmikroskops verwendet. Vier verschiedene Diodenlaser lieferten die Anregungswellenlängen 408, 488, 561 und 633 nm. Als Objektiv kam ein Leica HCX PL APO mit 100facher Vergrößerung zum Einsatz. Zur Steuerung des Gerätes diente die Software Leica LAS AF, mit der auch die anschließende Bildbearbeitung durchgeführt wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten TIRF-Beobachtungen fanden an der apikalen Seite der MDCK-Zellen statt. Dies stellte zunächst eine technische Herausforderung dar, da die Zellen mit ihrer basalen Seite auf dem Objektträger wachsen. In diesem Zustand könnte also nur eine Aufnahme der basalen Seite in Betracht kommen. Da aber das Interesse eher auf der apikalen Seite der Zellen lag, wurden diese auf PET-Filtern ausgesät und bis zur vollständigen Polarität kultiviert. Danach wurden die Filter ausgeschnitten und mit der apikalen Seite nach unten auf den Glasboden der Zellkammer des Mikroskops gelegt. In dieser Orientierung konnte der apikale Bereich der Zellen in das evaneszente Feld des TIRF-Mikroskops gerückt werden.

2.13.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (KLSM)

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie macht es möglich, die Fluoreszenz einzelner dünner Schichten des Präparates anzuregen und zu detektieren. Eine wichtige Rolle dabei spielen zwei Lochblenden im Strahlengang des Mikroskops. Vor dem Präparat befindet sich eine Lochblende im Anregungswellenlicht, die das ankommende Licht auf eine bestimmte Ebene fokussiert und den Rest ausblendet. Ebenso lässt eine weitere Lochblende nur einen bestimmten Teil des vom Präparat emittierten Lichtes passieren. Haben beide Lochblenden denselben Brennpunkt so sind sie konfokal. Auf diese Weise erreicht man, dass nur eine bestimmte Ebene des Präparates beleuchtet wird und auch nur das von dieser Ebene emittierte Licht detektiert wird. Streulicht wird ausgeblendet und man erreicht eine gegenüber der klassischen Epifluoreszenzmikroskopie deutlich verbesserte Auflösung. Als Lichtquelle dienen Laser, die Emission wird von einem Scankopf detektiert.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen entstanden am Leica DM IRE2/SP2 mit einem HCX PL APO 63x/1,2 W CORR Objektiv. Für die Anregungswellenlängen 488 nm wurde ein Argon-Ionen Laser verwendet, für die Wellenlänge 543 nm ein HeNe-Laser, sowie ein weiterer HeNe-Laser für die Wellenlänge 633 nm.

2.13.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

MDCK_{p75-GFP}-Zellen wurden in Paraformaldehyd (4 %) fixiert und für Aufnahmen mittels eines Transmissions-Elektronenmikroskops nach Immunogoldmarkierung zu Dr. Martina Schmitz an der Universität Münster geschickt.

2.14 Sub-Klonierung Mx1-GFP

Canines Mx1 wurde nach einem Standardprotokoll aus einem pCMV-Vektor in einen pEGFP-C2-Vektor über die Schnittstellen *Bgl*III und *Kpn*I umklont.

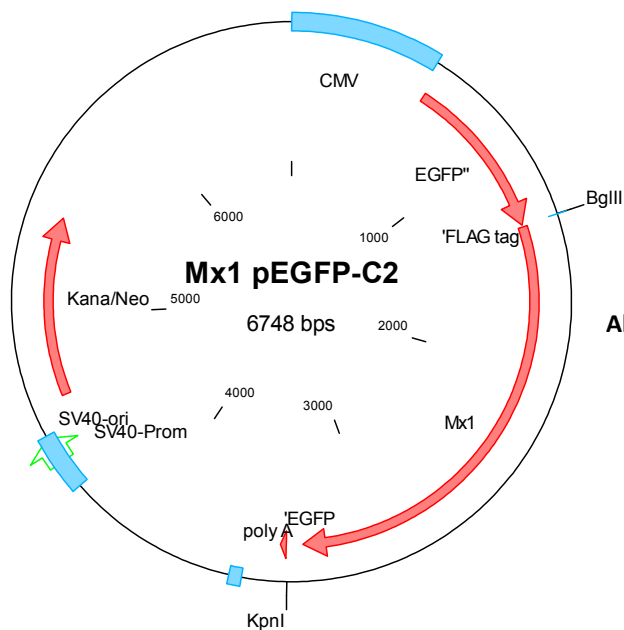


Abbildung 2.5: Expressionsvektor Mx1-pEGFP-C2

2.15 Galectin-3-Sekretion

Um die Sekretion von Galectin-3 und den Einfluss von Mx1 darauf näher zu beleuchten wurden Mx1 *knock-down* Experimente durchgeführt und Galectin-3 sowohl im apikalen und basolateralen Kulturmedium als auch im Zelllysat nachgewiesen.

MDCK-Zellen wurden bis zum Erreichen voller Polarität für sechs Tage auf PET-Filtern kultiviert. Dann wurden sie zunächst dreimal mit PBS gewaschen und für 2 h in MEM (ohne FKS, ohne PSG, ohne pH-Indikator) bei 37°C kultiviert. Dieses Medium wurde zu je einem ml apikal und basolateral gegeben. Dann wurde damit eine TCA-Fällung durchgeführt. Im anschließenden Western-Blot wurden Galectin-3 und weitere Proteine nachgewiesen. Aus den auf dem Filter verbliebenen Zellen wurde ein Lysat erstellt. Hierzu wurden 250 µl Standard-Lysispuffer (+10 µl/ml PI) auf die Zellen gegeben, diese wurden darin abgeschabt und für 30 min bei 4°C geschwenkt. Durch 5minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurden Zellkerne und Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in Lämmli-Puffer (3x) aufgenommen und mit den TCA gefällten Proben im Western-Blot analysiert.

2.16 Aufnahme von rekombinantem Galectin-3 aus dem apikalen Medium

Es wurde bereits publiziert, dass Galectin-3 zu einem geringen Maße am apikalen Zellpol sekretiert wird (Lindstedt et al., 1993). Deshalb stellte sich die Frage, ob Galectin-3 auch wieder aufgenommen werden würde. Zur Klärung dieser Frage wurde rekombinantes humanes Galectin-3 auf MDCK-Zellen gegeben und beobachtet, ob dieses in die Zellen aufgenommen wurde. Die Analyse erfolgte sowohl mikroskopisch im TIRF-Mikroskop, als auch biochemisch im Western-Blot. In der TIRF-Analyse konnte ebenso erforscht werden, ob Galectin-3 bei der Aufnahme in die Zelle ein Clathrin-, Flotillin- oder Caveolin-Kompartiment passieren würde. In der biochemischen Analyse wurde darauf eingegangen, ob sich die Aufnahme von Galectin-3 durch das Blockieren diverser Endozytose-Mechanismen behindern ließe.

2.16.1 TIRF-Analyse

MDCK_{Gal3-DsRed/Cav1-YFP}, MDCK_{Gal3-DsRed/Flot1-GFP} und MDCK_{Gal3-DsRed/Clathrin-CFP} Zellen wurden mindestens fünf Tage vor Versuchsbeginn auf 24-Well-PET-Filter ausgesät und bei 37°C kultiviert. Dann wurden die Zellen für zweimal 30 min mit MEM (-/-) bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit

vorgekühltem PBS⁺⁺ gewaschen. Nun folgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit 200 µl rekombinantem Galectin-3-Alexa633 (1 µM in PBS⁺⁺) auf Eis. Im unteren Teil der Filter-Wellen befanden sich 200 µl MEM (-/-). Im Anschluss daran wurden die Zellen wieder bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte die Galectin-3-Aufnahme gestartet werden und die Zellen wurden nach 0, 5, 10 und 60 min im TIRF-Mikroskop betrachtet, nachdem nicht gebundenes Galectin-3-Alexa633 durch zweimaliges waschen mit Essigsäure (0,2 %) und dreimaliges waschen mit PBS⁺⁺ entfernt wurde.

2.16.2 Western-Blot-Analyse

Voll auspolarisierte, in 6cm-Schalen gewachsene MDCK-Zellen wurden für zweimal 30 min in MEM (-/-, d. h. ohne FKS, ohne PSG) bei 37°C inkubiert. Darauf wurde zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Durch diesen Schritt wurde bereits im Medium vorhandenes Galectin-3 entfernt. Nun folgte die Zugabe von rekombinantem humanen Galectin-3 (1 µM), welches in PBS⁺⁺ verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf Eis (4°C). In dieser Lösung befanden sich außerdem diverse Hemmer spezieller Endozytose-Wege. Chlorpromazin (50 µM) ist ein effizienter Inhibitor der Clathrin-abhängigen Endozytose, während Filipin (3 µM) und Methyl-β-Cyclodextrin (10 mM) den Lipid-Raft-abhängigen Endozytoseweg hemmen. Nach diesen 30 min wurden die Zellen bei einer Endozytose ermöglichenden Temperatur von 37°C inkubiert. Nach 10 min bei 37°C wurde das PBS⁺⁺ samt rekombinantem Galectin-3 und Endozytosehemmern abgenommen und durch PBS⁺⁺ mit den Endozytosehemmern ersetzt und für weitere 35 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das noch auf der Oberfläche der Zellen verbliebene rekombinante Galectin-3 durch einen zweimal 5-minütigen Waschschrift mit 0,2 %iger Essigsäure bei 4°C abgewaschen. Außerdem wurde noch zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und die Zellen dann für 30 min in 250 µl Co-IP-Puffer lysiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Lämmli-Puffer (3x) aufgenommen und im Western-Blot analysiert. In einem parallel laufenden Versuchsansatz wurde der 37°C-Schritt übergangen und die Zellen wurden direkt nach der Galectin-3-Inkubation bei 4°C mit Essigsäure und PBS⁺⁺ gewaschen und in Co-IP-Puffer lysiert. Diese Ansätze stellten den Nullwert da.

2.17 Methoden zur Untersuchung der Rolle von Galectin-3 in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen

2.17.1 Messung der Galectin-3-Expression in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Um das Expressionslevel von Galectin-3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen zu überprüfen wurden nach folgendem Vorgehen Lysate hergestellt. Humane Nierengewebeblöcke aus gesundem (Normal) und entartetem (Tumor) Gewebe und einem Bereich dazwischen (Übergang) von ungefähr 0,5 cm Kantenlänge wurden mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators in 10 ml Co-IP-Puffer (+10 µl PI/ml) homogenisiert und für 30 min bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurden Zell- und Gewebetrümmer bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. 1 ml davon wurde in ein Kryogefäß aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Später wurden 20 µl davon mit 10 µl Lämmli-Puffer (3x) vermischt und im SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot analysiert. Mit dem Rest des oben erhaltenen Überstandes (ca. 9 ml) wurden Co-IP-Experimente durchgeführt.

2.17.2 Co-Immunpräzipitation von Galectin-3 in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Zu den ca. 9 ml des Zelllysates (s.o.) wurden 4,5 µl Galectin-3-Antikörper (pAb, 169) gegeben, nachdem ein einstündiger *Preclearing*-Schritt mit 200 µl PAS durchgeführt wurde (s. 2.3 Co-Immunpräzipitation). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde für 2 h 500 µl PAS zugegeben und bei 4°C geschwenkt. Nach 1 min Zentrifugation bei 800 rpm wurde das erhaltene Pellet zweimal mit PBS (0,1 % NP-40) und viermal mit PBS gewaschen und anschließend im SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.18 Chemikalien und Geräte

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid	Rotiphorese Gel30 Roth
Acrylamid (MALDI)	BioRad 40 %
Ammoniumsulfat	Fluka
Ampholyte	GE Healthcare IPG Buffer 3-10
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck
ASB-14	Calbiochem
CHAPS	usb
Cycloheximid	Fluka
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
EDTA	Roth
FKS (fötales Kälberserum)	Gibco
G 418 (Geneticin)	
Glucose	Sigma
Galactose	
Lactose	
Glycerol	Merck
Harnstoff	Amersham Bioscience
Jodacetamid	Sigma
Kaliumcarbonat	Sigma
Lipofectamin	invitrogen
Luminol	Pierce
Matrix (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure)	Bruker Daltonics
Milchpulver	Töpfer
Natriumdeoxycholat	MP Biomedicals
Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat	Merck
NP-40 (Alternative)	Calbiochem
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo
PDA (Piperazin-Di-Acrylamid)	BioRad
PAS (Protein-A-Sepharose)	Amersham Pharmacia Biotech
PSG (Penicillin, Streptomycin, Glutamin)	PAA
SDS	Roth
Silbernitrat	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth
Thio-Harnstoff	Sigma
Tris (Tris (hydroxymethyl) aminoethan)	Roth
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA
Trypsin	Sigma
Tween-20	AppliChem
Tx-100	Sigma
Zeocin	invitrogen
Allgemein gebräuchliche, nicht aufgeführte Reagenzien sind mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Sigma, ICN, Merck, Serva, Fluka oder von Riedel-de Häen bezogen.	

Tabelle 2.10: Chemikalien

Proteaseinhibitoren			
	Lösung 1:	25 µl PMSF 3,4 mg/ml (DMSO)	
	Lösung 2:	20µl Pepstatin 1 mg/ml (DMSO) 20µl Antipain 1 mg/200 µl (DMSO) 20µl Leupeptin 1 mg/200 µl (PBS) 20µl Aprotinin 1 mg/ml (PBS) 20µl Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor 25 mg/500 µl (PBS)	in 20 ml PBS
Gebrauchslösung: 25 µl von Lösung 1 + 500 µl von Lösung 2			

Tabelle 2.11: Proteaseinhibitoren

Allgemein:	
Tischzentrifuge	Biofuge-pico, Heraeus
Tisch-Kühlzentrifuge	Biofuge-fresco, Heraeus
Ultrazentrifugen	Sorvall Ultracentrifuge Combi Plus Beckmann Coulter Optima LE-80K
Rotoren (Ausschwingrotoren)	TH 641 (Sorvall) SW 41 (Beckmann)
Inkubatoren	Heraeus
Mikroskop	Leica Typ DM-IRB
Mikroskop (KLSM)	Leica TCS SP2
Mikroskop (TIRF)	Leica AM TIRF MC auf Basis des DMI 6000 B
Proteomics:	
Isoelektrische Fokussierungssystem	GE Healthcare Ettan IPGphor3
2D-Gelelektrophoresekammer	BioRad Protean II xi Cell
MALDI-TOF Target	Bruker Daltonics MTP 384 ground steel T F
Probenladespitzen	Millipore ZipTip C18
MALDI-TOF Massenspektrometer	Bruker Daltonics Ultraflex TOF/TOF MALDI
SDS-Gelelektrophorese:	
Glasplatten, Kämme, Spacer, Gießvorrichtung	BioRad
Gelkammer	Hoefer
Blot-Apparat	BioRad
Netzgerät	Amersham
Kamera	Chemi Lux-Imager
Zellkultur:	
Kulturschalen	Sarstaedt
Spritzen, Kanülen	Sarstaedt
MEM	PAA
DMEM	PAA

Tabelle 2.12: Geräte und Zellkulturmaterial

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in drei Teilbereiche. Im ersten Abschnitt (3.1) geht es um die Relevanz der α -Kinase ALPK1 im **apikalen Proteintransport von Mäusedünndarmzellen**, die in ALPK1-Knockout-Mäusen untersucht wurde. Im zweiten Abschnitt (ab 3.2) werden Ergebnisse aus Experimenten zum **apikalen Proteintransport in MDCK-Zellen** vorgestellt. Dabei ging es um die Identifizierung und Charakterisierung von Komponenten des apikalen, Lipid-Raft-unabhängigen Transportweges und deren Verknüpfung zur unkonventionellen Sekretion des Sortierrezeptors Galectin-3. Der letzte Abschnitt (3.12) widmet sich der Untersuchung der **Expressionsrate von Galectin-3 im klarzelligen humanen Nierenzellkarzinom**.

3.1 Trafficking apikaler Markerproteine in ALPK1-Knockout-Mäusen

ALPK1 ist eine α -Kinase mit Einfluss auf den Transport apikaler Lipid-Raft-assoziiierter Proteine in MDCK-Zellen. Beobachtungen von Heine *et al.* deuten darauf hin, dass ALPK1 das Motorprotein **Myosin I** phosphoryliert, welches im apikalen Transport Lipid-Raft-assoziiierter Proteine involviert ist (Heine et al., 2005). Um den Einfluss von ALPK1 auf den Transport apikaler Proteine in einem vollständigen Organismus zu überprüfen, wurden Darmpräparate von ALPK1-Knockout-Mäusen (A. Ryazanov, Piscataway) mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen unter dem KLSM betrachtet. Da die ALPK1 in MDCK-Zellen offensichtlich ausschließlich im Lipid-Raft-abhängigen Transport eine Rolle spielt, sollte hier dieser Transportweg, aber auch der Lipid-Raft-unabhängige, untersucht werden. Als apikale Lipid-Raft assoziierte Marker dienten die **Saccharase-Isomaltase (SI)** (Alfalah et al., 1999) und die **Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV)** (Alfalah et al., 2002; Slimane et al., 2001). Als apikales nicht mit Lipid-Rafts assoziiertes Protein wurde die **Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH)** untersucht (Jacob and Naim, 2001). Um den Einfluss des ALPK1-Knockouts auf den Transport basolateraler Proteine zu untersuchen wurde zusätzlich nach dem Verteilungsmuster des basalen Markers **E-Cadherin** gesehen. Bei allen Bildern handelt es sich um Dünnschnitte aus dem Dünndarm der jeweiligen Mäuse, die nach ihrem Tod in Carnoy fixiert und mit Antikörpern gegen das jeweilige Protein markiert wurden. Zur Detektion im KLSM dienten Alexa488 oder Alexa546 gekoppelte Zweitantikörper.

Betrachtet man die Wildtyp-Situation der einzelnen Proteine, so fällt zunächst auf, dass SI und LPH zu einem weitaus stärkeren Grad im Bürstensaum vorhanden sind als DPP IV (**Abb. 3.1**). Um also Vergleiche ziehen zu können sollte man sich nicht nur die totale Menge an Protein im Bürstensaum

ansehen, sondern auch das Verhältnis zwischen Protein im Bürstensaum zu Protein im Zellinneren. Im Falle der SI ist zu beobachten, dass in den Bürstensaum der ALPK1-Knockout-Mäuse weniger dieser Isomaltase gelangt als in den der WT-Mäuse. Es ist allerdings keine Akkumulation des Proteins im Zellinneren zu sehen. Dies ist im Falle des zweiten Lipid-Raft assoziierten Proteins – DPP IV – der Fall. Hier scheint der Knockout der ALPK1 dazu zu führen, dass nicht transportiertes Protein in der Zelle verbleibt. Im Gegensatz dazu scheint der korrekte Transport der nicht Lipid-Raft assoziierten LPH und der Transport basolateraler Proteine (**Abb. 3.2**) durch den Ausfall der ALPK1 nicht beeinflusst zu werden.

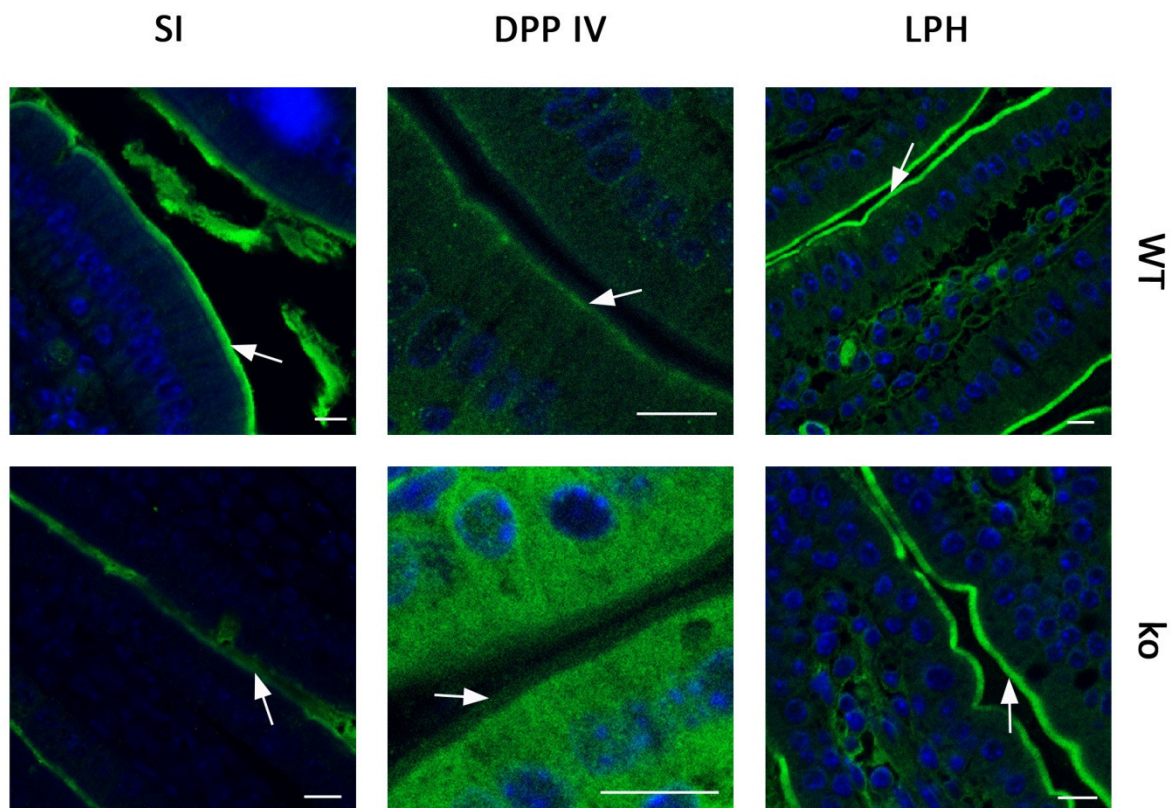


Abbildung 3.1: Verteilung apikaler Markerproteine in ALPK1-Knockout-Mäusen

Die Darmgewebe der Mäuse wurden jeweils mit α -SI, α -DPP IV oder α -LPH-Antikörpern markiert und im KLSM analysiert. Es wird deutlich, dass die beiden Lipid-Raft assoziierten Proteine SI und DPP IV in den Knockout-Mäusen zu einem geringeren Anteil in den Bürstensaum, sprich die apikale Zytoplasmamembran-Domäne (Pfeile, vgl. Abb.1.1), der Darmzellen gelangen als das nicht mit Lipid-Rafts assoziierte Protein LPH. Im Fall von DPP IV zeigt sich eine Akkumulation im Zellinneren. WT: Wildtyp, ko: Knockout, Maßstab: 10 μ m

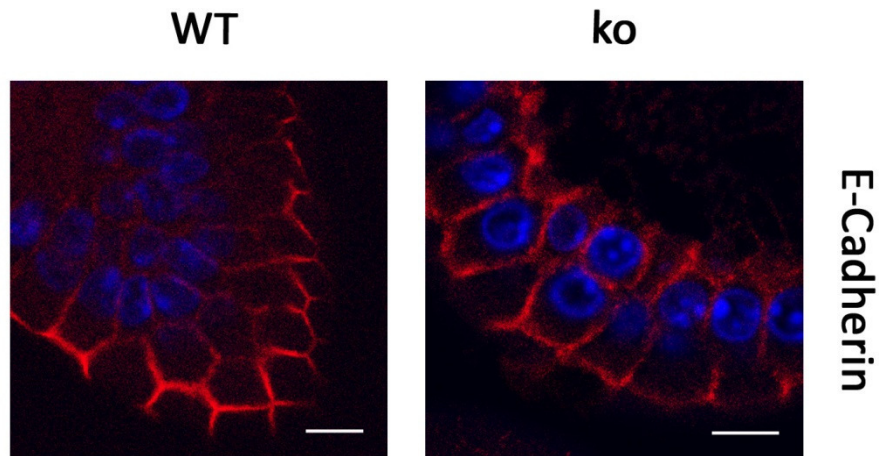


Abbildung 3.2: Die Verteilung von E-Cadherin in ALPK1-Knockout-Mäusen

Maudarmgewebe von WT und Knockout-Mäusen (ko) wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung auf den basalen Marker E-Cadherin untersucht. Da E-Cadherin weiterhin in die basale Membran transportiert wird, scheint das Fehlen der ALPK1 keinen Einfluss auf den basolateralen Transportweg zu haben. Maßstab: 10 µm

In der Quantifizierung wurde die Proteinmenge im Bürstensaum zur Proteinmenge im Zellinneren ins Verhältnis gesetzt. Die Proteinmenge, die in den WT-Mäusen in den Bürstensaum transportiert wurde, galt dann als 100 %. So kann gezeigt werden, dass die LPH in den ALPK1-Knockout-Mäusen noch zu ca. 91 % (+/- 29 %) in den Bürstensaum transportiert wird. Währenddessen gelangt das Lipid-Raft-assoziierte Protein SI nur noch zu 60 % (+/-20 %) an seinen Bestimmungsort. Noch drastischer fällt die Transporteffizienz im Falle der DPP IV aus. Hier gelangen nur noch ca. 40 % (+/-10 %) in die apikale Zytoplasmamembran (**Abb. 3.3**). Zusammenfassend ist es möglich zu sagen, dass der Knockout der ALPK1 in Mäusen zu einer verminderten Transporteffizienz der beiden Lipid-Raft-assoziierten Proteine SI und DPP IV führt. Der Transport des nicht in diesen Detergens resistenten Membranmikrodomänen vorkommenden Proteins LPH scheint hingegen nur geringfügig beeinflusst zu sein. Dabei fällt auf, dass SI und DPP IV nicht in die basolaterale Zytoplasmamembran fehlsortiert werden, sondern höchstens im Zellinneren akkumulieren. Dies deutet nochmals darauf hin, dass es sich bei der ALPK1 nicht um einen Sortierrezeptor handelt, sondern um eine Komponente des Proteintransports, deren Fehlen eine Verlangsamung oder den Ausfall des Transportes bedeutet.

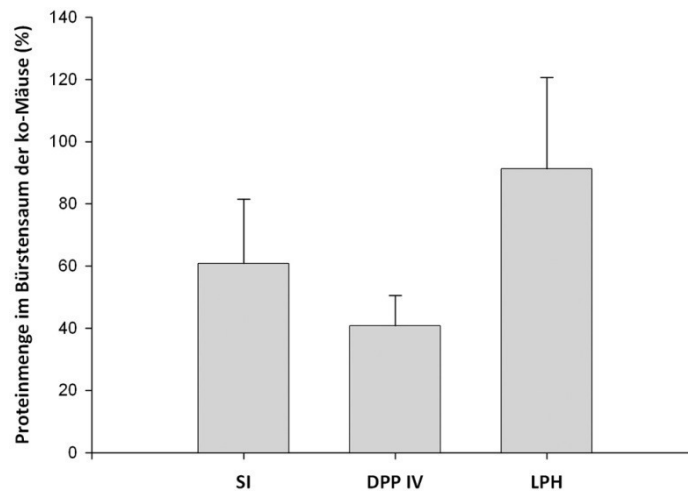


Abbildung 3.3: Quantifizierung des Proteintransports in den Bürstensaum der ALPK1-Knockout-Mäuse

Diese Abbildung zeigt die densitometrische Quantifizierung der in Abb.3.1 gezeigten Gewebeschnitte von jeweils 2 WT- und 2 Knockout-Mäusen pro Markerprotein (a 10 Messwerte). Die Proteinmenge des jeweiligen Proteins im WT entspricht 100 %. Im Vergleich dazu werden in den ALPK1-Knockout-Mäusen die SI nur noch zu 60 % (+/-20 %) und DPP IV nur noch zu 40 % (+/-10 %) in die apikale Zytoplasmamembran transportiert. Das Lipid-Raft-unabhängige Protein LPH hingegen gelangt noch zu 91 % (+/-29 %) in den Bürstensaum.

3.2 Identifikation von Proteinen in P75-GFP-Vesikeln nach TGN-Exit

3.2.1 Aufreinigung von P75-GFP-Vesikeln

Der **Neurotrophinrezeptor P75** ist in MDCK-Zellen ein exogenes Protein, welches von **Galectin-3** zur apikalen Zytoplasmamembran dirigiert wird (Delacour et al., 2006). Galectin-3 ist der Sortierrezeptor für nicht mit Lipid-Rafts assoziierte Glykoproteine in MDCK-Zellen. Es bildet über seine CRD Komplexe mit den zu sortierenden Proteinen und multimerisiert dabei mit weiteren Galectin-3-Glykoprotein-Komplexen (Delacour et al., 2007). Diese Bildung hochmolekularer Komplexe stellt den eigentlichen Sortiermechanismus für P75 dar. Dabei steht zur Debatte, wie die Abschnürung der P75-Galectin-3-Vesikel aus dem *post*-Golgi-Sortierkompartiment erfolgen könnte. Etwaige Mantel- oder Adapterproteine bzw. Dynamine waren bis dato nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden in diesem Versuchsabschnitt P75-GFP-Vesikel mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Präzipitation mit Hilfe eines α -GFP-Antikörpers durchgeführt. Dieser Antikörper bindet dabei an den ins Zytosol ragenden C-Terminus, an welchem sich der GFP-Tag befindet. Mit den so erhaltenen Vesikeln sollte im Anschluss eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt werden und die Identität der enthaltenen Proteine mittels MALDI-TOF ermittelt werden.

Abb. 3.4 A zeigt zunächst die Verteilung von P75-Vesikeln im Dichtegradienten. Dafür wurden Fraktionen einer Vesikelpräparation aus MDCK_{P75-GFP}-Zellen von 1 ml Volumen von oben aus den Gradienten entnommen und nach TCA-Fällung im Western-Blot analysiert. Es zeigte sich, dass die P75-GFP-enthaltenden Vesikel in den Fraktionen 2 bis 5 gehäuft vorkamen. Diese Erkenntnis sorgte dafür, dass für die anschließende Präzipitation der Vesikel ausschließlich die oben genannten Fraktionen benutzt wurden.

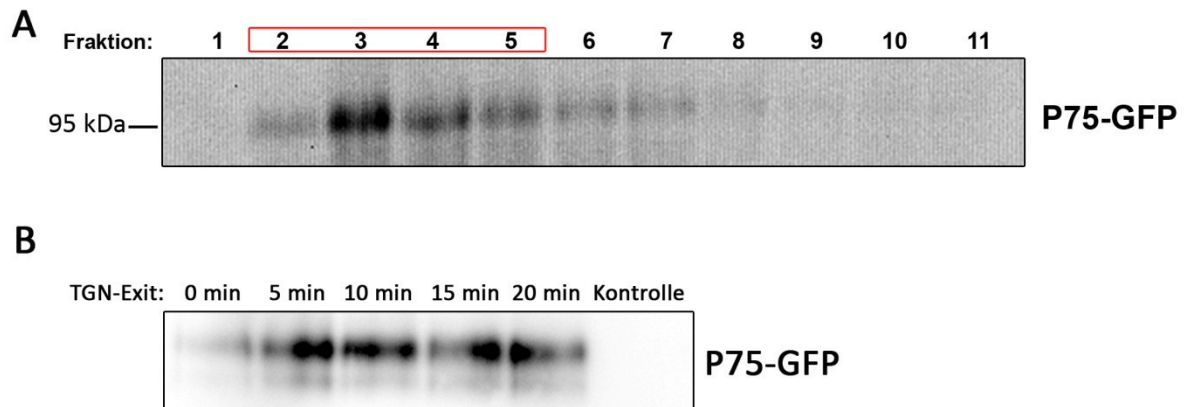


Abbildung 3.4: Aufreinigung von P75-GFP-Vesikeln

Mit sechs Platten 5 Tage alter MDCK_{P75-GFP}-Zellen wurde nach deren Lyse eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt und im Western-Blot analysiert. Der Großteil P75-GFP enthaltender Vesikel sammelte sich in den Fraktionen zwei bis fünf (von oben). Für die darauf folgenden Versuche wurden dann jeweils aus diesen Fraktionen P75-GFP-Vesikel immunopräzipitiert. B) Pro angegebenen Zeitpunkt nach TGN-Exit wurde eine P75-GFP-Vesikel-IP durchgeführt und im Western-Blot analysiert. Erst ab einem Zeitpunkt von 5 min nach Verlassen des TGN lassen sich P75-GFP-Vesikel aufreinigen. Im Kontrollversuch wurden MDCK-WT-Zellen verwendet, die kein P75-GFP exprimieren.

Für die P75-Vesikel-Präzipitation wurden die Fraktionen 2 bis 5 aus dem Dichtegradienten mit jeweils 0,3 µl α-GFP-Antikörper versetzt und anschließend mit PAS präzipitiert. **Abb. 3.4 B** zeigt die Vesikel-Präzipitation von MDCK_{P75-GFP}-Zellen nachdem diese einem TGN-Exit-Experiment unterzogen wurden. Der Zeitpunkt 0 min markiert den Moment in dem P75-GFP das TGN noch nicht verlassen hat. Folglich existieren auch keine P75-GFP-Vesikel, im Western-Blot ist ein sehr schwaches P75-GFP-Signal zu sehen. 5 min nachdem P75-GFP das TGN verlassen hat ist es möglich Vesikel, die diesen Neurotrophinrezeptor tragen, aufzureinigen. Dies scheint auch noch 10, 15 und 20 min nach TGN-Exit der Fall zu sein. Als Kontrolle wurde eine Vesikel-IP mit MDCK-WT-Zellen durchgeführt, die genau wie die MDCK_{P75-GFP}-Zellen mit α-GFP-Antikörper inkubiert wurden. Da die WT-Zellen kein P75-GFP exprimieren, kann dieses folglich auch nicht präzipitiert werden. Dies zeigt an, dass es sich bei den Banden bei ca. 100 kDa im Western-Blot um ein spezifisches P75-GFP-Signal handelt.

3.2.2 2D-Gelelektrophorese von P75-GFP-Vesikeln nach TGN-Exit

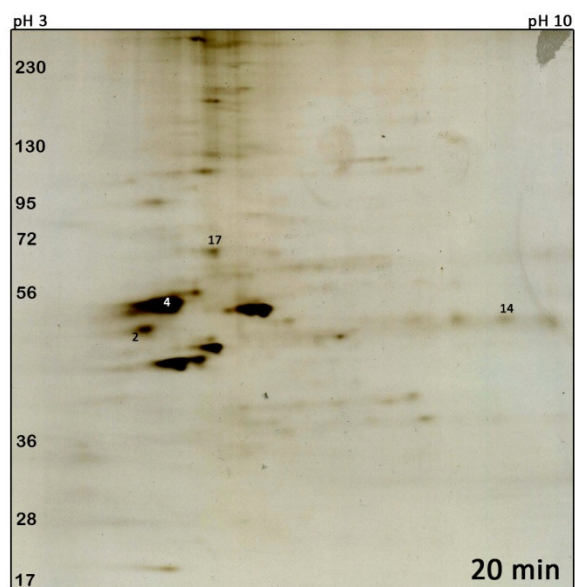
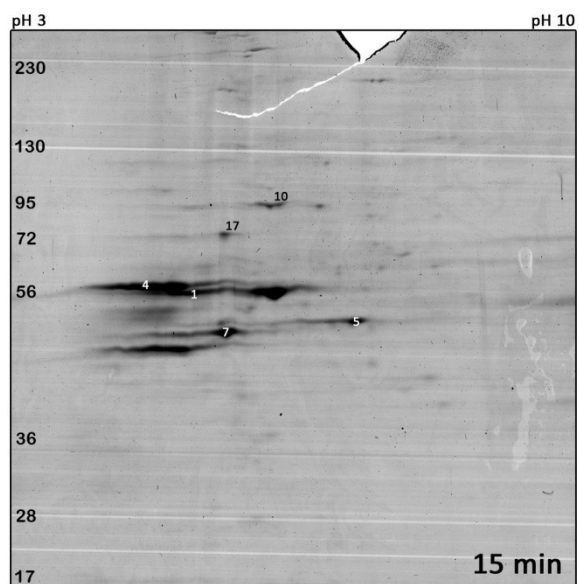
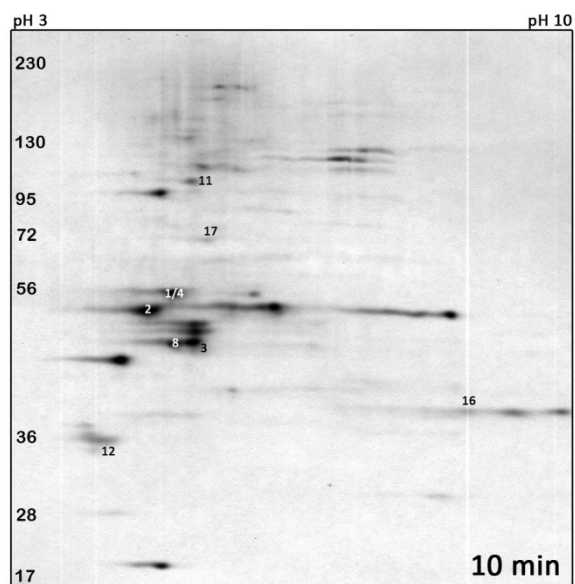
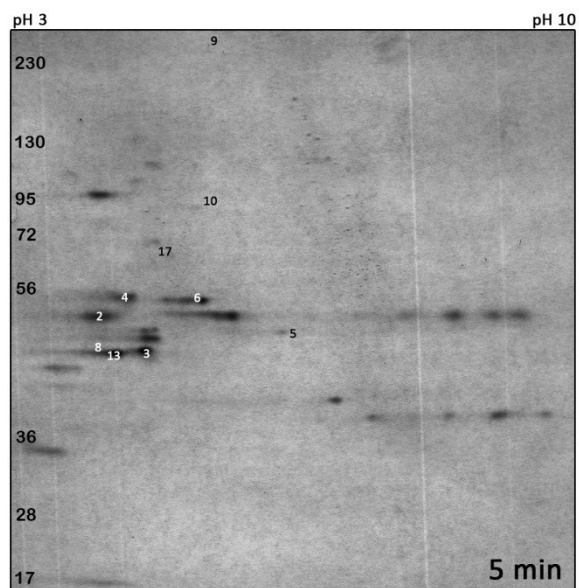
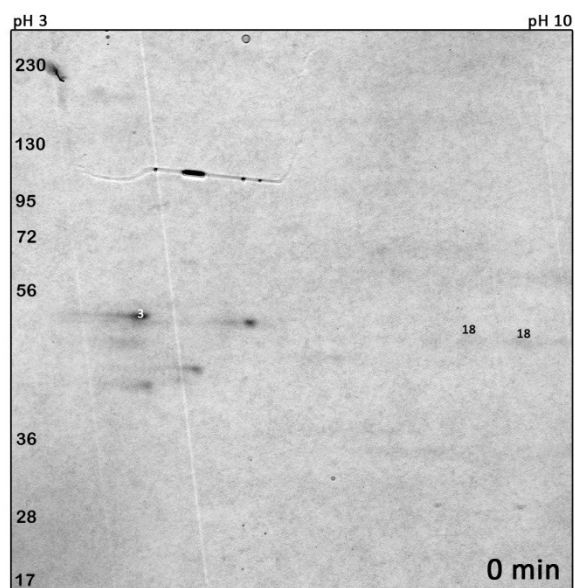
Für die Identifizierung der Proteinzusammensetzung der P75-GFP-Vesikel wurde mit diesen zunächst eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei handelte es sich um Gradientengele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 6-16 % und einem pH-Bereich von 3 bis 10. Für jedes einzelne 2D-Gel wurden P75-GFP-Vesikel aus 48 Platten (10 cm) MDCK_{P75-GFP}-Zellen isoliert. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit den zu verschiedenen Zeitpunkten nach TGN-Exit aufgereinigten Vesikeln einer Coomassiefärbung mit anschließender Silberfärbung unterzogen. Wie zunächst zu erkennen ist, scheint sich die Anzahl und Zusammensetzung der Proteine im Laufe der Zeit auf dem Weg vom TGN zur Zytoplasmamembran zu ändern. Der Zeitpunkt 0 min markiert auch hier den Moment, in dem noch keine P75-Vesikel gebildet wurden, weil alle Proteine des sekretorischen Weges noch im TGN geblockt werden. Identifiziert werden konnten hier β -Actin (Spot 3) und die für die IP benutzten Antikörper (Spot 18). Nach 5 min steigt die Vielfalt an Proteinen in den P75-GFP-Vesikeln. Es sind etwa 25 verschiedene Proteinspots zu erkennen, wovon 9 identifiziert werden konnten. Darunter befinden sich u. a. die Zytoskelettelemente β -Tubulin (Spot 2) und diverse Zytokeratine (Spots 5 – 8). Zytokeratine treten oft in MALDI-TOF-Analysen als Verunreinigungen durch den Experimentator auf. Allerdings werden sie auch wie im Fall von Zytokeratin 8 (Typ II) und Zytokeratin 18 (Typ I) mit intrazellulären Transportprozessen in Verbindung gebracht. Diese sind am Transport des mutierten Chloridkanals CFTR zur Zytoplasmamembran beteiligt (Davezac et al., 2004). Über eine Rolle bei der Beförderung apikaler Proteine in MDCK-Zellen kann nur spekuliert werden. Als weiteres Intermediärfilament taucht in den Vesikeln immer wieder Vimentin auf, über dessen Aufgabe bisher wenig bekannt ist. Als interessanter Marker, der Aufschluss über die Identität des Kompartiments geben könnte, indem sich die Proteine zum Zeitpunkt 5 min befanden ist Rab7 (Spot 13). Hier steht eine relativ klare Identifizierung im MALDI-TOF einer nicht erwarteten Laufhöhe im 2D-SDS-Gel gegenüber. Rab7 ist eigentlich nur 24 kDa groß, im Gel aber bei ca. 45 kDa zu finden. Dies lässt Spekulationen über eine mögliche Modifizierung zu, die das Laufverhalten beeinträchtigt. Ein Protein, welches im Verlauf dieser Dissertation eine wichtige Rolle einnimmt, ist das bisher nur als antiviral wirkend eingestufte Protein **Mx1** (Spot 10). Wie hieran anschließende Ergebnisse zeigen werden, scheint diese Dynamin-ähnliche GTPase auch eine Funktion im intrazellulären Proteintransport zu besitzen. 10 min nach Verlassen des TGN steigt die Anzahl der Proteine in den aufgereinigten Vesikeln auf über 30. Von diesen wurden wiederum 9 identifiziert. Dabei handelte es sich um die bereits erwähnten Zytoskelettproteine. Zusätzlich ließ sich eine TER-ATPase (Spot 11) identifizieren, die normalerweise für die Abspaltung von Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist. Möglicherweise wird diese ATPase noch eine Weile mit den Vesikeln, die sie erzeugt hat mittransportiert und ist somit noch in P75-GFP-Vesikeln zu finden. Als

endosomal Marker konnte hier Rab4A (Spot 12) gefunden werden. Dieses ist ein typischer Marker für frühe Endosomen. Zum Zeitpunkt 15 min nach TGN-Exit bleibt die Anzahl der Proteinspots weitestgehend konstant. Hier ließen sich leider keine weiteren neuen Proteine identifizieren. Ein weiteres Mal ist hier Mx1 (Spot 10) zu finden. Der letzte aufgenommene Zeitpunkt nachdem die P75-GFP-Vesikel das TGN verlassen hatten war der Punkt 20 min. Auch hier war die Ausbeute an identifizierten Proteinen gering. Lediglich Rab19 ließ sich als ein endosomal Marker mit bislang unbekannter Funktion und Vorkommen bestimmen. Allerdings mit einer nur geringen Sequenzabdeckung.

Bei dieser Datenanalyse sollte berücksichtigt werden, dass sich die Identifizierung eines Proteins nicht gleichzeitig mit dessen Vorhandensein in den Vesikeln deckt. D. h. nur weil ein bestimmtes Protein nicht im MALDI-TOF identifiziert werden konnte, heißt das nicht, dass es in den Vesikeln nicht vorhanden ist. So ist z. B. Mx1 nur zu den Zeitpunkten 5 und 15 min nach TGN-Exit massenspektrometrisch identifiziert worden. Bei genauem Hinsehen ist allerdings zu erkennen, dass auch zu anderen Zeitpunkten an der entsprechenden Stelle im Gel ein Protein erscheint, höchstwahrscheinlich Mx1. Dieses Beispiel gilt auch für weitere Proteinspots. Verunreinigungen z. B. aus dem Zytoplasma können dabei nicht ausgeschlossen werden, wie die ständige Gegenwart des zytosolischen Proteins HSP-71 (Spot 17) beweist. Nichtsdestotrotz ist mit der Identifizierung von Mx1 als eine Komponente mit Einfluss auf den sekretorischen Weg ein Protein gefunden worden, dessen genauere Rolle im Verlauf dieser Dissertation geklärt werden sollte.

Abbildung 3.5: 2D-Gelelektrophorese von P75-GFP-Vesikeln nach TGN-Exit

(Nächste Seite) Zu verschiedenen Zeiten nach TGN-Exit aufgereinigte und immunopräzipitierte P75-GFP-Vesikel wurden in 2D-Gelexperimenten untersucht. Pro Gel wurden je 48 Platten MDCK_{P75-GFP}-Zellen verwendet. Es wird deutlich, dass die Anzahl der Proteinspots – also die Anzahl der verschiedenen Proteine in den Vesikeln – nach Verlassen des TGN stetig zunimmt. Einige Proteine verlassen nach einer Zeit die Vesikel, andere kommen hinzu. Die mit Nummern versehenen Proteinspots konnten im MALDI-TOF-Massenspektrometer identifiziert werden (s. Tabelle 3.1). Links: Protein-Standard-Marker (kDa)



Die in der MALDI-TOF-Analyse ermittelten „Peptid-Fingerabdrücke“ wurden mittels der Suchmaschinen MASCOT Peptide Mass Fingerprint (Matrix Science), PROFOUND (Prowl, Rockefeller) oder ALDENTE (ExpASY Proteomics Server) mit im Internet hinterlegten Datenbanken verglichen. Ab einer von der jeweiligen Suchmaschine selbst festgelegten Übereinstimmung wurden die Proteine in die unten stehende Tabelle aufgenommen. Die teilweise niedrige Ermittlungsquote konnte oft an der mangelnden Datenlage bezüglich des hinterlegten Hundeproteoms festgemacht werden. Zudem sollte in Betracht gezogen werden, dass es sich bei dem in Datenbanken hinterlegten Hundegenom um das eines Boxers handelt, während die in dieser Dissertation verwendeten MDCK-Zellen aus einem Cocker-Spaniel entnommen wurden.

Spot-Nr.	Identität	Accession-Nr.	MW (kDa)	pI	Übereinstimmende Peptide	Sequenz-übereinstimmung (%)	Protein-Kategorie
1	α -Tubulin	A24903	50	5,0	15	47	Zytoskelett
2	β -Tubulin	S01713	50	4,8	15	23	
3	β -Actin	O18840	41	6,0	9	17	
4	Vimentin	P84198	54	5,0	30	58	
5	Keratin, Typ II Zytoskelett 7	P08729	51	5,4	12	21	
6	Keratin, Typ II Zytoskelett 8	P05786	53	5,6	10	18	
7	Keratin, Typ I Zytoskelett 18	Q5BJY9	48	5,2	11	27	
8	Keratin, Typ I Zytoskelett 19	P08728	44	4,9	19	27	
9	Myosin-11	O08638	223	5,4	11	7	
10	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	Q9N0Y3	75	5,6	24	45	Vesikel-Abschnürung
11	TER-ATPase	P03974	89	5,1	15	27	
12	Rab-4A	gi73952624	25	5,8	5	44	endosomale Marker
13	Rab-7	P18067	24	6,4	5	21	
14	Rab-19	P35294	24		4		
15	FAM45B		40		7		
16	GAPDH	Q28259	36	8,5	9	35	Zytosol
17	HSP-70	A2Q0Z1	71	5,4	13	24	
18	IgG (rabbit)						Antikörper

Tabelle 3.1: In P75-GFP-Vesikeln identifizierte Proteine

3.3 Mx1 ist Bestandteil nicht mit Lipid-Rafts assoziierter apikaler Transportvesikel

Mx1 ist eine große GTPase mit Dynamin-ähnlicher Struktur. Mit diesen Voraussetzungen galt es zu überprüfen, ob dieses in anderen Zellen normalerweise streng Interferon induzierte Protein möglicherweise für die Abschnürung von **P75-Vesikeln** verantwortlich sein könnte. Bisher wurde nur an der Aufklärung der antiviralen Aktivität von Mx1 gearbeitet. Dabei bindet es z. B. an diverse virale Proteine und behindert so deren Funktion (Haller and Kochs, 2002). Des Weiteren ist bekannt, dass humanes MxA Membranen tubulieren kann (Accola et al., 2002). Dies nährte den Verdacht einer Dynamin-ähnlichen Funktion im P75-Trafficking. Die in der Massenspektrometrie erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Anwesenheit von Mx1 in P75-GFP-Vesikeln sollte zunächst biochemisch bestätigt werden. Hierfür wurde genau wie für die 2D-Gel-Analyse vorgegangen, mit dem Unterschied, dass in diesem Fall eine klassische 1D SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durchgeführt wurde. Zu verschiedenen Zeiten nach TGN-Exit aufgereinigte P75-GFP-Vesikel wurden also auf das Vorhandensein von Mx1 überprüft. Wie **Abb. 3.6 B** zeigt, befindet sich der Großteil von Mx1 in den P75-GFP-Vesikeln, die das TGN vor 5 Minuten verlassen haben. Auch nach 0 Minuten ist bereits ein Anteil von Mx1 zu beobachten. Dies verwundert zunächst. Betrachtet man allerdings das P75-GFP-Signal im Western-Blot, so wird klar, dass auch zum Zeitpunkt 0 Minuten bereits eine geringe Menge von P75-Vesikeln zu finden ist. Hierbei steht zur Diskussion, ob es sich dabei um Vesikel handelt, die im P75-GFP-Recycling an der Zelloberfläche beteiligt sind und somit der TGN-Restriktion bei 20°C nicht unterliegen, oder ob es sich dabei um eine gewisse Ungenauigkeit im experimentellen Ablauf handelt. Es wäre durchaus möglich, dass bei warmen Außentemperaturen der ca. 1 min dauernde Transfer der Zellen vom 20°C-Inkubator in den 37°C-Inkubator bereits eine Temperatur in den Zellen herbeiführt, die den TGN-Block aufhebt. Dies würde zu einem frühzeitigen Entlassen der Vesikel aus dem TGN führen und die Differenz zu den in den 2D-Gelen gemachten Beobachtungen erklären. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass der apikale Sortierrezeptor Galectin-3 in die P75-GFP-Vesikel gelangt, 5 min nachdem diese das TGN verlassen haben (Delacour et al., 2006; Delacour et al., 2007). **Abb. 3.6 C** zeigt an, dass Mx1 offensichtlich ausschließlich im Lipid-Raft-unabhängigen Transport zu finden ist. In den aufgereinigten SI-YFP-Vesikeln scheint Mx1 nicht vorzukommen. Dabei fällt auf, dass Mx1 gelegentlich in Doppel- bzw. Dreifachbanden auftaucht. Dies lässt sich mit Degradationsprozessen oder Modifikationen erklären.

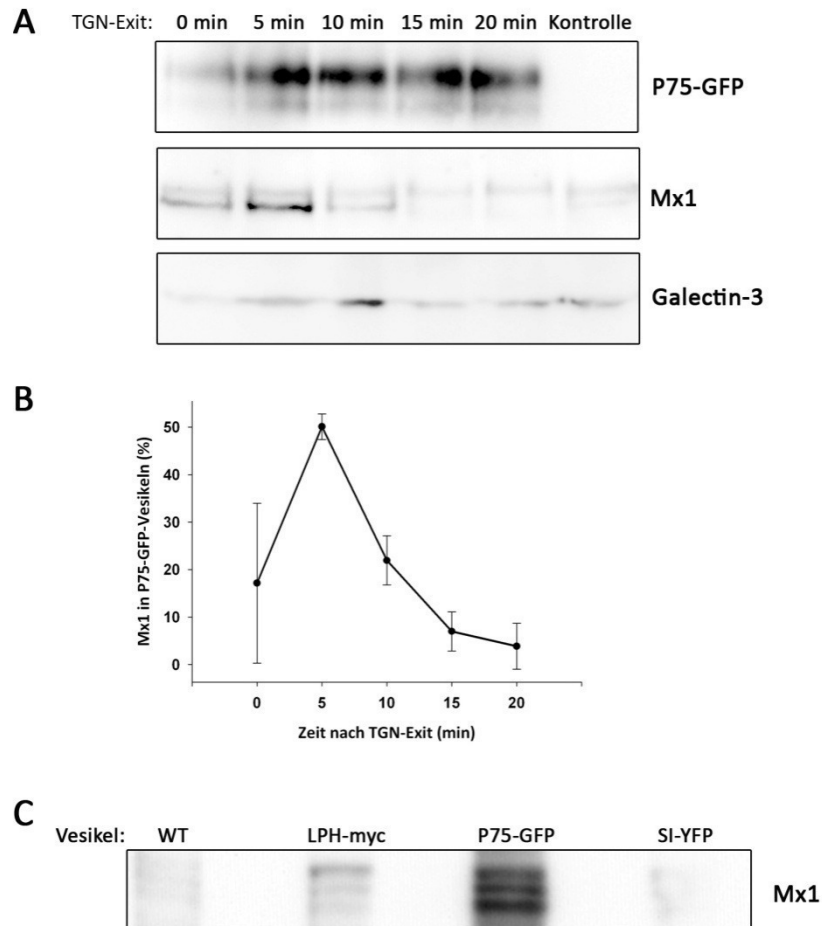


Abbildung 3.6: Mx1 befindet sich in Vesikeln des apikalen nicht Lipid-Raft-Transportweges

A) P75-GFP-Vesikel wurden zu verschiedenen Zeiten nach TGN-Exit immunpräzipitiert und im Western-Blot analysiert. Während Mx1 sehr früh in/an den Vesikeln anwesend ist, gelangt Galectin-3 erst nach 10 min hinein. Als Kontrolle wurde eine Vesikel-IP mit MDCK-WT-Zellen durchgeführt. B) Die Quantifizierung zeigt, dass der Anteil von Mx1 in P75-GFP-Vesikeln am höchsten ist, wenn diese 5 min zuvor das TGN verlassen haben C) Um die Exklusivität von Mx1 für den Lipid-Raft-unabhängigen Transportweg zu beweisen, wurden verschiedene Vesikelpopulationen aufgereinigt. Darunter die in Lipid-Rafts transportierte SI und die beiden nicht mit diesen Membranmikrodomänen assoziierten Proteine LPH und P75. Mx1 scheint dabei nur in den nicht Lipid-Raft-Vesikeln aufzutauchen.

3.4 Erstellen einer stabilen MDCK_{Mx1-GFP}-Zelllinie

Um fluoreszenzmikroskopische Daten zu Mx1 sammeln zu können, wurde das Mx1-Gen in einen pEGFP-C2-Vektor kloniert und dieser in MDCK-Zellen transfiziert. Da es sich bei einem Mx1-GFP-Fusionsprotein nicht um die WT-Form des Proteins handelt, sollte zunächst geklärt werden, ob sich das fluoreszierende Protein im Mikroskop ähnlich verhielt wie das WT-Protein. Also wurden MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen mit einem monoklonalen α -Mx1-Antikörper inkubiert, welcher wiederum mit einem α -Maus-Alexa546-Antikörper detektiert wurde. **Abb. 3.7** macht deutlich, dass sich die beiden Signale weitestgehend entsprechen. Der Antikörper detektiert sowohl das endogene als auch das exogene Mx1. Als Kontrolle wurde der fluoreszierende Zweitantikörper alleine auf die MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen gegeben. Hier zeigte sich wie erwartet kein Signal. Des Weiteren wurden MDCK-WT-Zellen mit demselben α -Mx1-Antikörper inkubiert wie die MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen. Auch hier zeigte sich die netzartige Verteilung von Mx1 über die gesamte Zelle hinweg. Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass es sich bei dem Mx1-GFP-Fusionsprotein um eine fluoreszierende Mx1-Variante handelt, die sich, zumindest was ihren Habitus im Fluoreszenzmikroskop betrifft, vom endogenen Protein nicht unterscheidet.

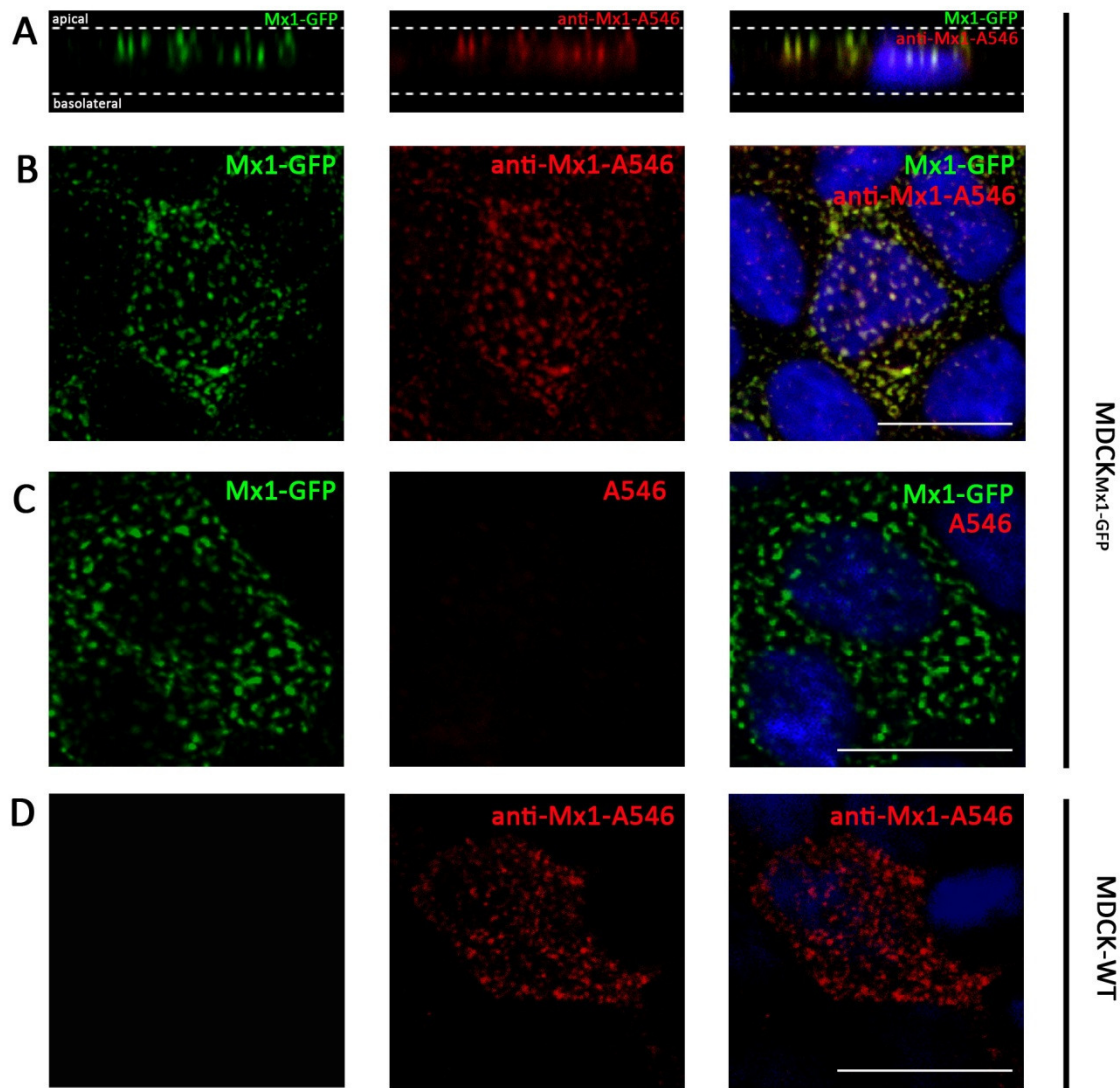


Abbildung 3.7: Vergleich von endogenem Mx1 mit Mx1-GFP

Polare MDCK-WT-Zellen und MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurden in PFA (4 %) fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit α -Mx-Antikörper (mAb, M143) unterzogen. A) zeigt den x/z-scan solcher Zellen. Es zeigt sich, dass Mx1 gehäuft an der apikalen Seite der Zellen in relativ großen Kompartimenten (\varnothing ca. 300 nm) anzutreffen ist. B) Wie auch in A) zu sehen ist, entspricht die mit dem Antikörper erzielte Färbung der des GFP-Signals, d. h. der Antikörper detektiert auch das exogene Mx1-GFP. Des Weiteren sind einzelne kleine rote Signale zu sehen, die nur das endogene Mx1 darstellen. C) zeigt die Kontrolle ohne α -Mx1-Antikörper. D) Hier wurden MDCK-WT-Zellen verwendet. Es zeigt sich eine mit dem Mx1-GFP-Signal vergleichbare Morphologie und Verteilung des Mx1-Signals.

Abb. 3.8 zeigt Mx1-GFP aufgenommen mit Hilfe verschiedener Mikroskopiertechniken. **Abb. 3.8 A** zeigt eine Übersichtsaufnahme einer stabil transfizierten MDCK_{Mx1-GFP}-Zelllinie. Es wird deutlich, dass Mx1-GFP in relativ großen Aggregaten auftaucht, die in xy-Richtung über die komplette Zelle verteilt sind. Die **Teilabbildungen B** und **C** verdeutlichen, dass es in der xz-Richtung eine deutliche

Verlagerung von Mx1-GFP in Richtung apikaler Zellpol gibt. Dies lässt sich an Hand der Detektionsmöglichkeit von Mx1-GFP im apikalen TIRF nachweisen. Wie in **Abb. 3.8 B** zu sehen ist, befindet sich ein Großteil der Mx1-GFP-Fluoreszenz innerhalb des 90 nm Detektionsbereichs des TIRF-Mikroskops. **Abb. 3.8 C** zeigt eine x/z-Aufnahme von MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen. Auch hier ist zu sehen, dass sich Mx1-GFP eher am apikalen Ende der Zelle befindet. In Teilabbildung D wurde ein z-Stapel einer MDCK_{Mx1-GFP}-Zelle mit Hilfe der Volocity-Software dekonvuliert und zu einem 3D-Bild zusammengefügt. Insgesamt wird deutlich, dass es sich um runde oder ovale Mx1-Ansammlungen handelt. Zu diesem Zeitpunkt war unklar, ob es sich dabei um von einer Membran umschlossene Kompartimente handelt oder um Mx1-GFP-Oligomere.

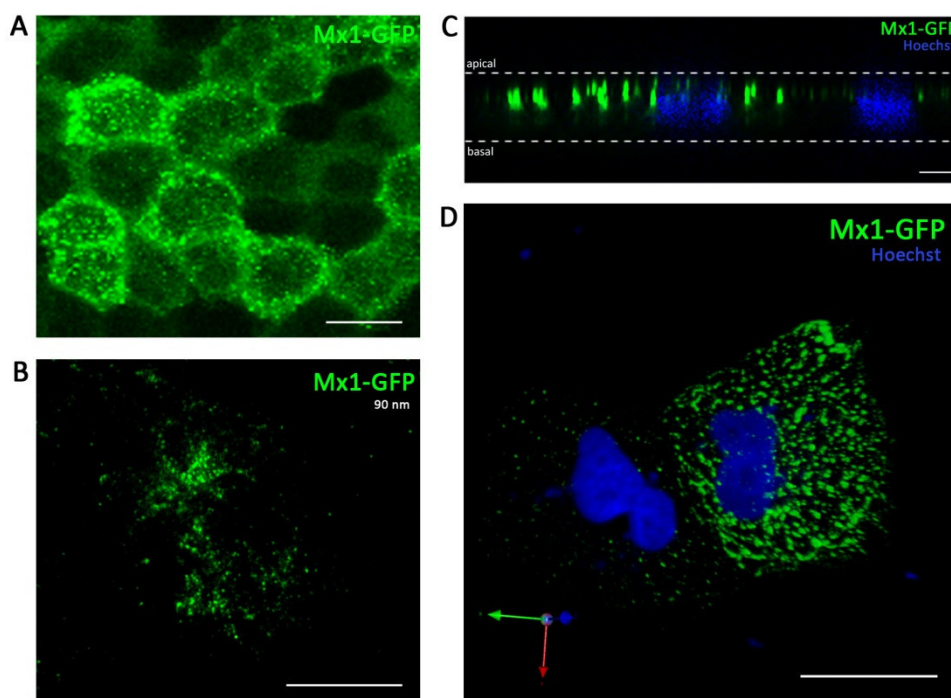


Abbildung 3.8: Mx1-GFP

Die Bilder zeigen Mx1-GFP in stabil transfizierten MDCK-Zellen aufgenommen und dargestellt mit verschiedenen Mikroskopiertechniken. A) Übersichtsaufnahme von konfluenten, polaren MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen. Mx1-GFP wird in der Horizontalen über die gesamte Zelle hinweg exprimiert. Die apikale TIRF-Aufnahme in B) und der x/z-scan in C) machen deutlich, dass Mx1-GFP in der Vertikalen gehäuft am apikalen Zellpol vorkommt. D) 3D-Rekonstruktion einer MDCK_{Mx1-GFP}-Zelle nach Dekonvolution von 28 Einzelbildern mit der Volocity-Software. Maßstab: 10 µm

3.5 Untersuchungen zur Rolle von Mx1 im apikalen Proteintransport

3.5.1 Mx1-GFP zeigt ein dynamisches Fissions- und Fusionsverhalten von Membranstrukturen

Bei der Aufnahme der ersten Bilder von MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen stellte sich die Frage nach der Beweglichkeit der Mx1-GFP-Strukturen. Deswegen wurden Lebendzellaufnahmen von auf PET-Filtern gewachsenen MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen erstellt. Die unten aufgeführten Bildfolgeaufnahmen stellen nur eine kleine Auswahl immer wiederkehrender Phänomene von fusionierenden und sich teilenden Mx1-Aggregaten dar. Innerhalb einer Minute schließen sich die in **Abb. 3.9 A** dargestellten Mx1-GFP-Strukturen zu einem einzigen zusammen. Oft konnte auch beobachtet werden, dass sich aus diesem Zusammenschluss wieder Mx1-GFP-Elemente lösten und sich vom ursprünglichen Ort wegbewegten. **Abb. 3.9 B** zeigt einen solchen Abknospungsvorgang. Hier löst sich innerhalb von 60 s eine im Durchmesser etwa 300 nm breite Mx1-GFP-Struktur aus ihrem ursprünglichen Verband und verschwindet aus dem Fokus. Es stellte sich also heraus, dass es sich bei den Mx1-GFP-Strukturen um sehr bewegliche und dynamische Strukturen handelte, die immer wieder miteinander verschmolzen oder voneinander abknospten. Dabei stellte sich die Frage nach der Ursache und dem Grund für dieses Verhalten. Da es sich bei Mx1 um eine große GTPase mit Dynamin-ähnlicher Struktur handelt, war es nicht überraschend es in einer Zellstruktur vorzufinden, welche offensichtlich einer erhöhten Fusions- und Fissions-Dynamik unterliegt. Die Lebendzellaufnahmen legen nahe, dass Mx1, welches in MDCK-Zellen eine ausgewiesene geringe Anti-Influenza-Eigenschaft besitzt (Seitz et al., 2010), andere intrazelluläre Aufgaben besitzt, die möglicherweise im vesikulären Transport zu suchen sind. Dabei blieb nach wie vor ungeklärt ob - und falls ja um welches – Kompartiment es sich dabei handeln würde. Hier sollten weitere mikroskopische Untersuchungen Aufschluss geben. Außerdem wurde eine Membranaufreinigung mit MDCK-WT-Zellen durchgeführt. **Abb. 3.9 C** macht deutlich, dass es sich bei Mx1 sehr wahrscheinlich um ein Membran assoziiertes Protein handelt. In der rechten Spur wurde ein Totallysat von MDCK-WT-Zellen aufgetragen. Hierin befindet sich das zytosolische Protein GAPDH. Mx1 hingegen ist auch in der Zytosol-freien Membranaufreinigung in der linken Spur zu finden.

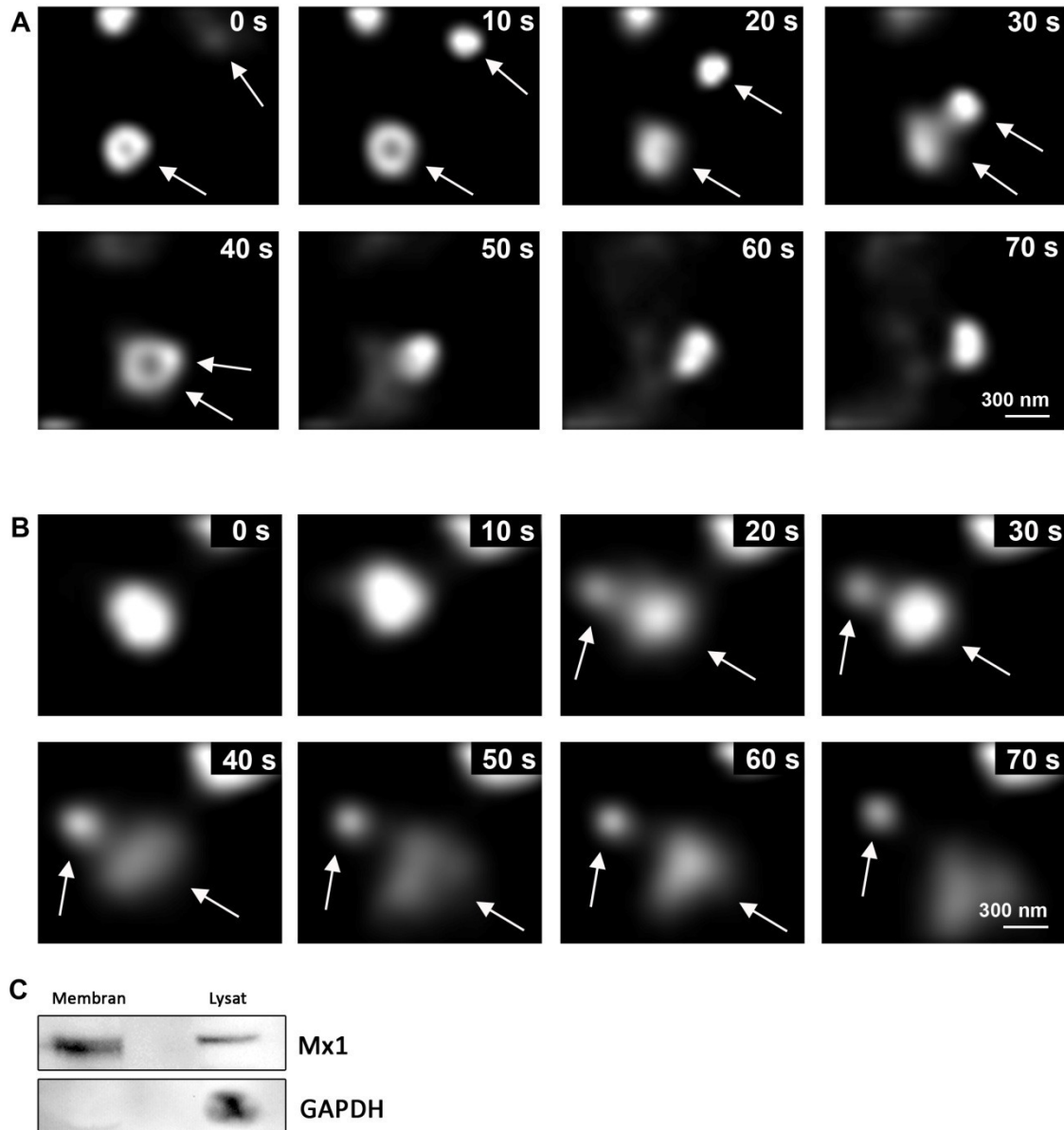


Abbildung 3.9: Fusion und Abspaltung von Mx1-GFP-tragenden Strukturen

MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurden für fünf Tage auf PET-Filtern kultiviert und im Epifluoreszenz-Mikroskop mit Autofokus betrachtet. Die Lebendzell-Aufnahmen zeigen dynamische Mx1-GFP tragende Strukturen (Pfeile), die miteinander fusionieren (A) oder sich voneinander abspalten (B). C) Mit MDCK-WT-Zellen wurde eine Membranaufreinigung durchgeführt. Während das zytosolische Protein GAPDH nur im Lysat auftaucht, befindet sich Mx1 auch in der Membranfraktion. s: Sekunden

3.5.2 Colokalisation von P75-DsRed und Mx1-GFP

Die Assoziation von Mx1 mit P75-GFP-Vesikeln wurde in der 2D-Gelelektrophorese mit anschließender MALDI-TOF-Analyse entdeckt. Nun sollte mit Hilfe von Fusionsproteinen diese Assoziation auch im KLSM überprüft werden. Hierfür wurde eine MDCK_{Mx1-GFP}-Zelllinie transient mit einem Plasmid

transfiziert auf welchem die genetische Information für ein **P75-DsRed-Fusionsprotein** gespeichert war. Wie die in **Abb. 3.10** gezeigte Aufnahme einer Zelle, welche beide Fusionsproteine enthält, verdeutlicht, kommt es des Öfteren zur Überlagerung der beiden Signale (Pfeile). An diesen Stellen scheinen Mx1-GFP und P75-DsRed in ein und demselben Kompartiment vorzukommen, was die massenspektrometrischen Daten untermauert.

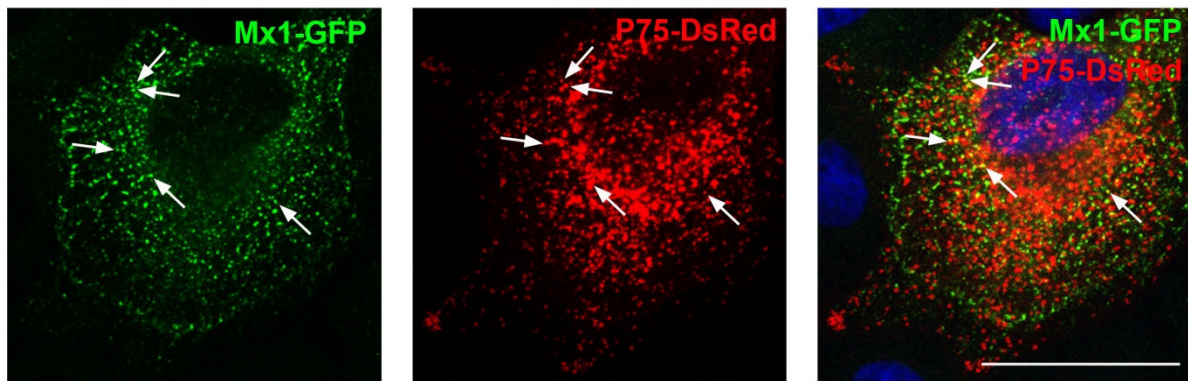


Abbildung 3.10: Colokalisierung von Mx1-GFP und P75-DsRed im KLSM

MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurden transient mit P75-DsRed transfiziert und im KLSM betrachtet. In der Überlagerung sind deutliche Colokalisierungen zu sehen (Pfeile). Meist befinden sich diese in perinukleärer Lage. Maßstab: 10 μ m

Nun stellte sich die Frage, ob P75 direkt mit Mx1 interagiert. Dies wurde in *pull-down*-Analysen überprüft. Wie **Abb. 3.11** zeigt, konnte weder P75 mit Mx1 noch Mx1 mit P75 copräzipitiert werden. Dies weist darauf hin, dass Mx1 und P75-GFP keine direkte Interaktion eingehen. Der Beweis, dass eine Co-Präzipitation von Mx1 an sich möglich ist, wird in **Abb. 3.19** aufgeführt.

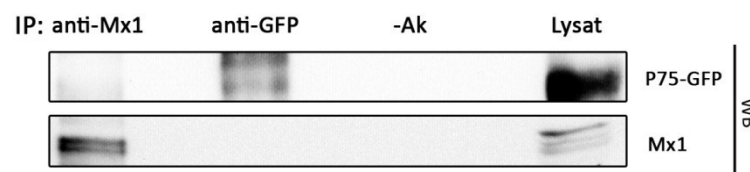


Abbildung 3.11: Co-Immunopräzipitation von Mx1 und P75

MDCK_{P75-GFP}-Zellen wurden in Co-IP-Puffer lysiert und mit den jeweils angegebenen Antikörpern inkubiert. Die PAS-Präzipitate wurden im Western-Blot analysiert. Es konnte nicht gezeigt werden, dass P75 mit Mx1 co-immunopräzipitiert oder umgekehrt.

3.5.3 Mx1-GFP und diverse zelluläre Marker

Um die Identität der Mx1-Ansammlungen weiter zu klären, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen von Mx1 gemeinsam mit mehreren anderen Proteinen gemacht. Aufgrund der beobachteten Dynamik der Mx1-Aggregate und einem Hinweis aus der Literatur (Racicot and Ott, 2010) sollte die Assoziation von Mx1 mit dem **Tubulin-Zytoskelett** überprüft werden. In MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz das Tubulin-Zytoskelett dargestellt. Hier zeigte sich eine deutliche Aufreihung von Mx1-haltigen Strukturen entlang von Mikrotubuli (**Abb. 3.12 C**). Außerdem wurde die Anwesenheit von Mx1 im **endoplasmatischen Reticulum** (ER) überprüft. Mit Mx1-GFP und ER-DsRed doppelt transfizierte MDCK-Zellen zeigten keine Colokalisierung der beiden Marker. Während sich das ER in filigranen netzartigen Strukturen rund um den Nukleus im Zytoplasma verteilt, verstreut sich Mx1-GFP eher gleichmäßig und in größeren Vesikel ähnlichen Strukturen durch die ganze Zelle. Auch mit dem lysosomalen Marker **LAMP2** kann Mx1 nicht zur Deckung gebracht werden. Schaut man allerdings auf den frühen Endosomen-Marker **EEA1**, so lassen sich gelegentlich Übereinstimmungen mit dem Mx1-GFP-Signal festmachen (Pfeile).

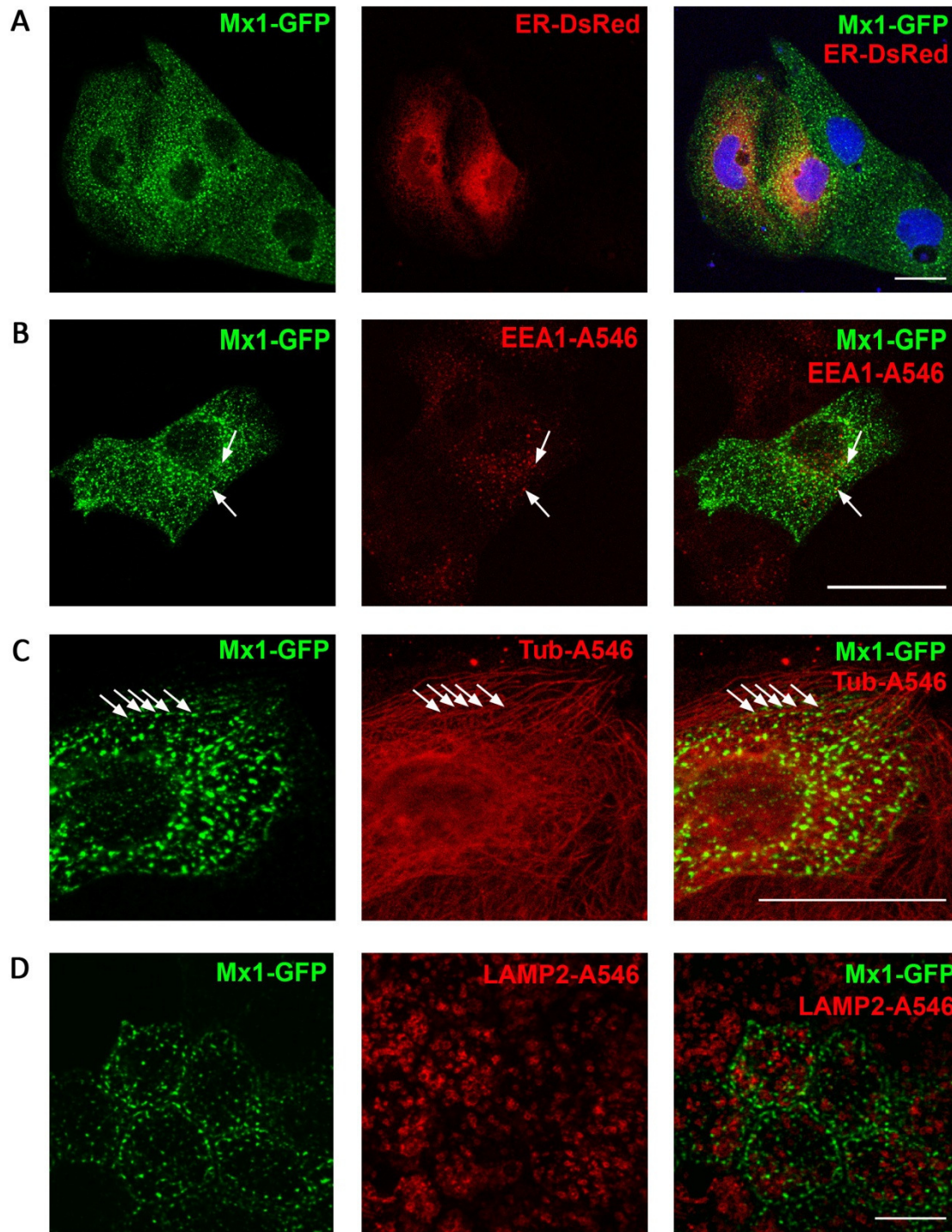


Abbildung 3.12: KLSM-Aufnahmen von Mx1-GFP und diversen zellulären Markern

A) MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurden mit dem ER-Marker ER-DsRed co-transfiziert. Während das ER vorwiegend in Kernnähe zu finden ist, erstreckt sich das Mx1-GFP-Signal über die gesamte Zelle. B) Mx1-GFP zeigt stellenweise Colokalisierung mit dem frühen Endosom-Marker EEA1. C) Färbt man in MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen das Tubulin-Zytoskelett so macht sich eine auffallende Aufreihung von Mx1-GFP-Kompartimenten entlang von Mikrotubuli-Strängen bemerkbar (Pfeile). D) Eine Colokalisierung von Mx1-GFP mit dem Lysosomen-Marker LAMP2 war nicht nachweisbar. EEA1: *Early endosome antigen 1*; LAMP2: *lysosomal membrane-associated protein 2*; Maßstab: 10 µm

3.5.4 Lokalisation von Mx1 in einem frühen endosomalen Kompartiment

Alle bisher erhaltenen Erkenntnisse ließen darauf schließen, dass es sich bei den Mx1-Ansammlungen um vesikuläre Strukturen handelte. Dabei gab es Übereinstimmungen mit Markern des endocytotischen Weges wie EEA1. Deshalb sollte noch etwas näher auf die Anwesenheit von Mx1 im Endozytoseweg eingegangen werden. Hierfür wurden MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung auf Colokalisationen von Mx1-GFP mit den Proteinen **Clathrin** (schwere Kette), **Dynamin-2** und **EEA1** untersucht. Wie bereits in **Abb. 3.12** gezeigt, konnte eine gelegentliche Übereinstimmung des Mx1-GFP-Signals mit dem von EEA1 bestätigt werden. Des Weiteren konnte eine selten vorkommende Interaktion von Mx1 mit Dynamin-2 beobachtet werden. Dies könnte auf eine mögliche Rolle von Mx1 als vesikulierendes oder tubulierendes Protein hinweisen, dass für die Abschnürung von P75-GFP-Vesikeln in Frage kommen könnte. Mit Clathrin gemeinsam ließ sich Mx1 nie beobachten.

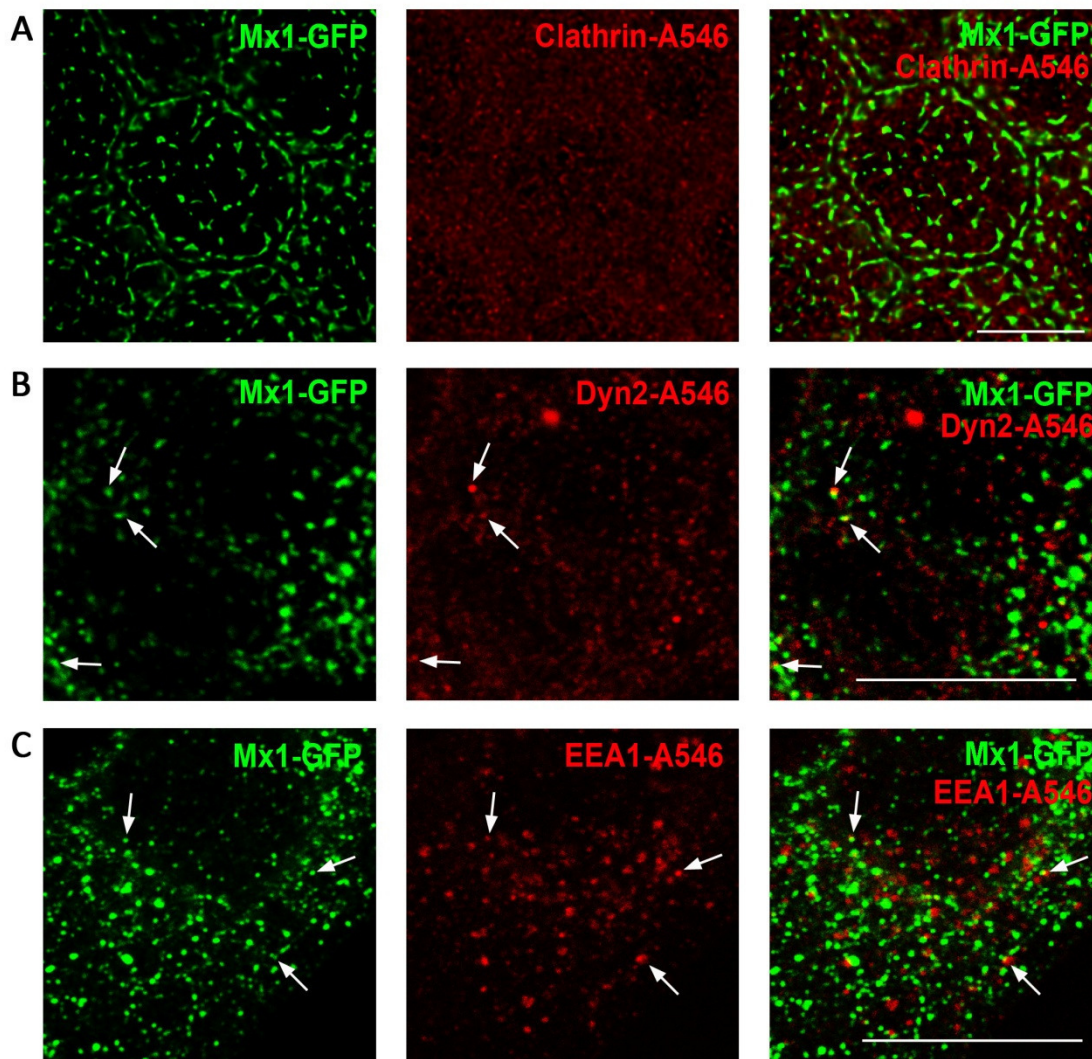


Abbildung 3.13: Mx1 im Endozytoseweg

MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung auf die Lage der im Endozytoseweg beteiligten Proteine Clathrin (A), Dynamin-2 (B) und EEA1 (C) geprüft. Es zeigte sich eine teilweise Colokalisation von Mx1-GFP mit Dynamin-2 und EEA1. Maßstab: 10 µm

Die Colokalisierung von Mx1 mit Dynamin-2 sollte näher untersucht werden. Möglicherweise könnten die Proteine Hetero-Oligomere mit dem jeweils anderen Protein ausbilden. Aufgrund der Strukturähnlichkeit wäre dies denkbar und wurde auch bereits in Mausgehirn-Extrakten nachgewiesen (Jatiani and Mittal, 2004). Auf dieser Annahme aufbauend wurde eine Co-Immunopräzipitation mit MDCK-WT-Zellen durchgeführt. Dabei wurde mit einem α -Mx1-Antikörper Mx1 präzipitiert und im anschließenden Western-Blot kontrolliert, ob Dynamin-2 copräzipitierte. Wie in **Abb. 3.14** zu sehen ist, war dies nicht der Fall. Daher bleibt ungeklärt, ob es sich bei der in **Abb. 3.13** gezeigten Colokalisation um eine stabile Interaktion handelt oder eine eher zufällige Assoziation, die auf Grund der Ähnlichkeit der beiden Proteine auftauchen könnte. Des Weiteren

konnte ein weiteres Mal, neben dem in **Abb. 3.19** gezeigten Versuch, keine direkte Interaktion zwischen Mx1 und α -Tubulin gezeigt werden. Wie in **Abb. 3.12** zu sehen ist, kommt es zwar zu einer gelegentlichen Aufreihung von Mx1-Strukturen entlang von Mikrotubuli. Diese scheint aber nicht von einer direkten Bindung von Mx1 an die einzelnen Tubulin-Untereinheiten abzuhängen. Dass Mx1-Interaktionen *per se* durch solch eine Co-Immunopräzipitation detektierbar sind, zeigt **Abb. 3.19**.

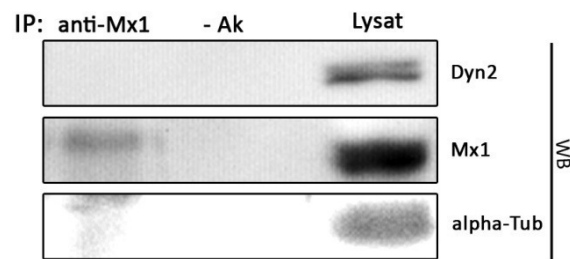


Abbildung 3.14: Co-Immunopräzipitation von Mx1 und Dynamin-2

Mx1 wurde aus MDCK-WT-Zellen mit einem polyklonalen α -Mx1-Antikörper präzipitiert und im Western-Blot detektiert. Nach dem Nachweis von Dynamin-2 und α -Tubulin zeigt sich, dass keins dieser beiden Proteine mit Mx-1 copräzipitiert wurde.

Anhand des Vergleichs mit diversen **Rab-Proteinen**, die charakteristisch für bestimmte Endosomen sind, sollte das zelluläre Kompartiment in dem Mx1 vorkommt, weiter bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden Aufnahmen von MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen gemacht, die in der Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen die endosomalen Marker Rab4, 8 und 11 behandelt wurden. Wie in **Abb. 3.15** gezeigt, gibt es zwischen dem frühen Endosomen-Marker Rab4 und Mx1-GFP des Öfteren Übereinstimmungen, während dies für den Marker für Recycling-Endosomen – Rab11 – nicht gilt. Auch der im TGN vorkommende Marker Rab8 zeigt wenig bis keine Colokalisierung mit Mx1-GFP. Betrachtet man diese Erkenntnisse gemeinsam, so lässt sich darauf schließen, dass die Rolle von Mx1 beim Trafficking apikaler nicht mit Lipid-Rafts assoziierten Proteinen möglicherweise in einem späten Traffickingschritt oder im Recycling dieser Proteine zu suchen ist. Allerdings kollidieren diese Daten mit der Tatsache, dass Mx1 in den 2D-Gel-Experimenten bereits nach 5 min in den P75-GFP-Vesikeln zu finden ist. Außerdem gibt es keine Übereinstimmungen zwischen Mx1 und dem Recycling-Endosomen-Marker Rab11.

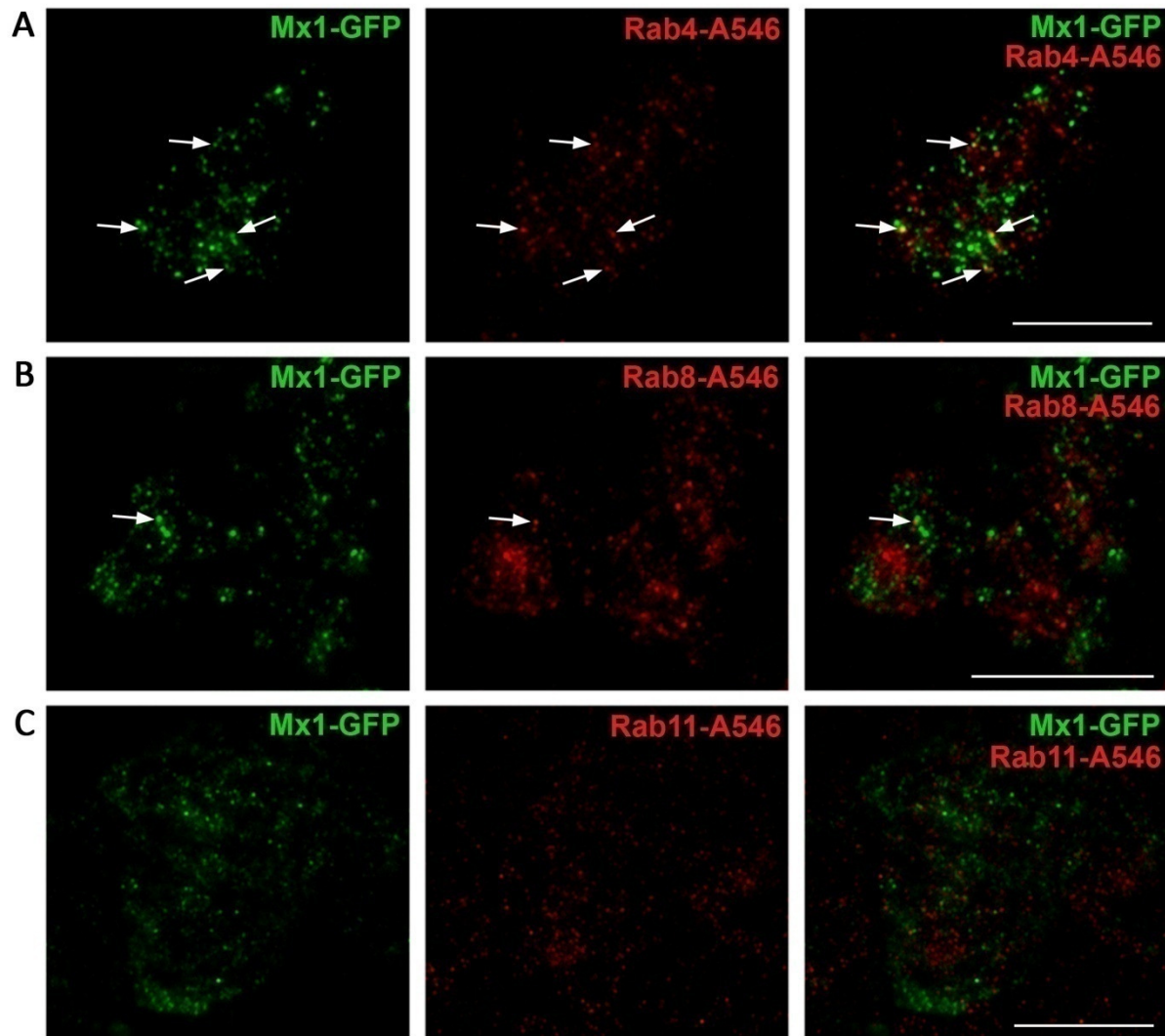


Abbildung 3.15: Mx1-GFP und Endosomen im apikalen TIRF

In 5 Tage alten, polaren, auf PET-Filtern gewachsenen MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurden die endosomalen Marker Rab4, 8 und 11 mit Antikörpern markiert und im apikalen TIRFM bei einer Eindringtiefe von 90 nm beobachtet. A) Hier ließ sich eine teilweise Übereinstimmung zwischen dem frühen Endosomen-Marker Rab4 und Mx1-GFP ausmachen (Pfeile). B) + C) Mit dem für Recycling-Endosomen typischen Marker Rab11 konnte Mx1-GFP nicht in Verbindung gebracht werden, während es mit dem im TGN zu findenden Rab8 sehr selten colokalisiert ist (Pfeil). Maßstab: 10 µm

3.6 Einfluss von Mx1 auf den apikalen Transport von P75

Nachdem festgestellt wurde, dass Mx1 speziell in nicht mit Lipid-Rafts assoziierten Vesikeln anzutreffen war, sollte untersucht werden, ob die Abwesenheit von Mx1 in der Zelle einen Einfluss auf den Transport von P75-GFP zur apikalen Zytoplasmamembran hatte. Aus diesem Grund wurde die Expression von Mx1 mittels siRNA-*knock-down*-Experimenten herabgesetzt und die Anwesenheit von P75-GFP auf der Zelloberfläche in einer Oberflächen-Immunopräzipitation kontrolliert.

Zunächst sollte jedoch die *knock-down*-Effizienz der Mx1-siRNA getestet werden. Hierfür wurde mit MDCK_{P75-GFP}-Zellen siRNA-*knock-down*-Experimente gegen Mx1 durchgeführt und die Proteinmenge von Mx1 im Western-Blot densitometrisch gemessen. Als Kontrolle diente die Transfektion der Zellen mit einer siRNA gegen ein Gen, welches in MDCK-Zellen nicht exprimiert wird. In diesem Fall die Luciferase. So können Effekte, die auf der Anwesenheit einer siRNA in der Zelle *per se* beruhen, ausgeschlossen werden. **Abb. 3.16 A** zeigt einen repräsentativen Western-Blot nach Mx1-*knock-down*. Wie die Quantifizierung von 3 Experimenten zeigte, konnte die Expression von Mx1 auf Protein-Ebene auf ca. 1 % (+/-1 %) der Ursprungsmenge reduziert werden. Dieser *knock-down* hatte offensichtlich keinen Einfluss auf den basolateralen Proteintransport oder die Polarität der Zellen wie in **Abb. 3.16 C** gezeigt wird. Hier wurden MDCK-Zellen nach Mx1-*knock-down* auf die Lage der basalen Marker **E-Cadherin** und **β-Catenin** untersucht. Wie in der Aufsicht und im x/z-Scan zu sehen ist, bleiben beide Proteine an ihrem Bestimmungsort.

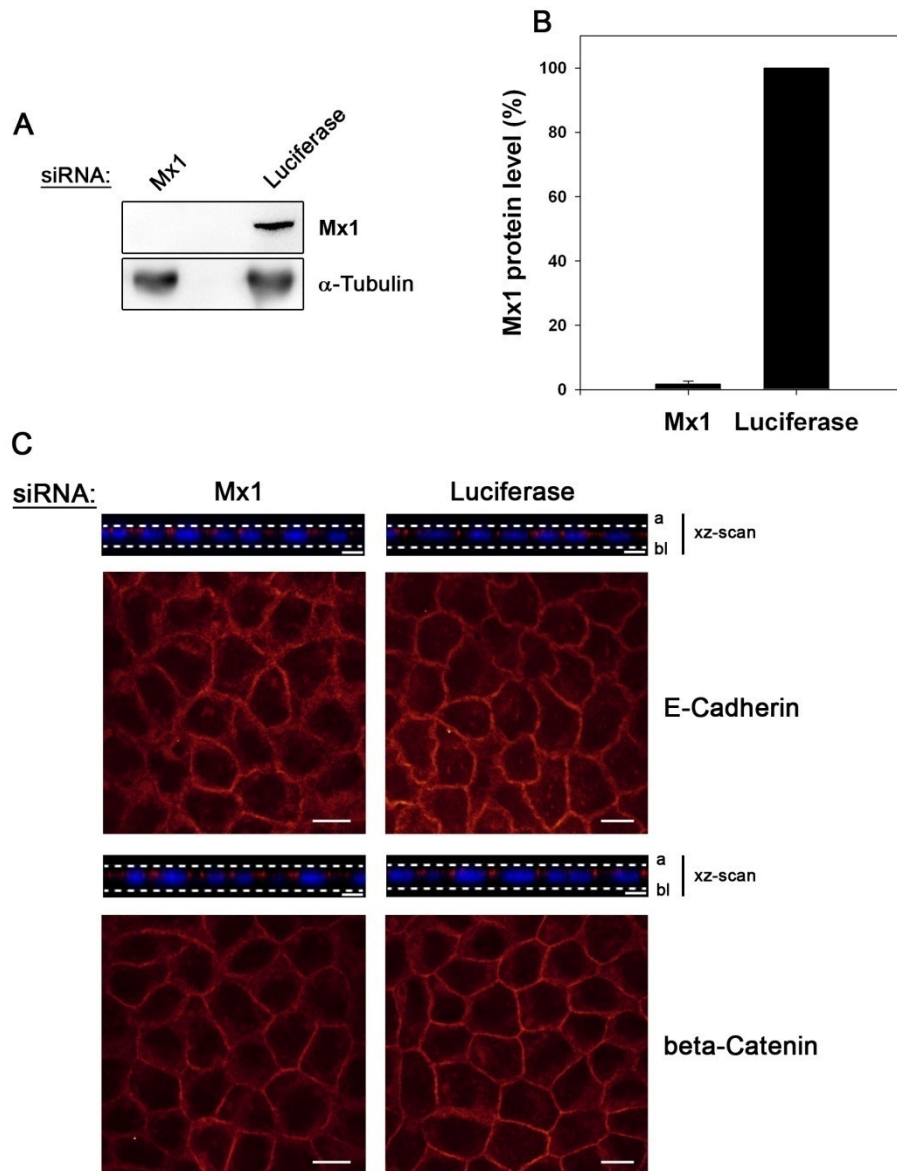


Abbildung 3.16: Knock-Down von Mx1 in MDCK-Zellen

A) MDCK-Zellen wurden für 6 Tage kultiviert. Am zweiten und am vierten Tag nach Aussaat wurde eine siRNA-Transfektion durchgeführt. Wie im Western-Blot und der anschließenden Quantifizierung in B) zu sehen ist wurde die Protein-Menge von Mx1 um ca. 99 % reduziert. Als Kontrolle diente α -Tubulin. B) In den wie unter A) beschriebenen Zellen wurden die lateralen Markerproteine E-Cadherin und β -Catenin angefärbt. Der *knock-down* von Mx-1 scheint keinen Einfluss auf deren korrekte Sortierung in die basolaterale Zytoplasmamembran zu haben. a: apikal; bl: basolateral; Maßstab: 10 μ m

Nachdem die *knock-down*-Effizienz der siRNA festgestellt worden war, konnte mit den Oberflächen-IP-Experimenten begonnen werden. Also wurden auf PET-Filtern gewachsene MDCK_{P75-GFP}-Zellen auf die Anwesenheit von P75-GFP auf deren Oberfläche getestet. Zuvor wurden die Zellen einen Tag nach ihrer Aussaat und an einem weiteren Tag mit siRNA gegen Mx1 behandelt. Die Oberflächen-IP

startete nach fünf Tagen, nachdem die Zellen vollständige Polarität erreicht hatten. Vergleicht man nun das P75-GFP-Signal auf der apikalen Oberfläche von Zellen mit *Mx1-knock-down* mit denen der Kontroll-siRNA, so lässt sich feststellen, dass P75-GFP in diesem Fall nicht mehr so effizient an die apikale Oberfläche gelangt. Es kommt dabei allerdings nicht zu einer Fehlsortierung von P75-GFP in die basolaterale Zytoplasmamembran. Hier ist P75-GFP in keinem Fall zu finden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei Mx1 um einen direkten Sortierrezeptor handelt. Wie in der Quantifizierung in **Abb. 3.17 B** zu sehen ist, gelangt das apikale Glykoprotein P75-GFP nach *knock-down* von Mx1 nur noch zu 34 % ($\pm 1,6$ %) auf die apikale Oberfläche. Dazu im Vergleich steht die Kontrollbehandlung der MDCK_{P75-GFP}-Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase. Hier gelangen rund 39 % ($\pm 1,6$ %) in die apikale Zytoplasmamembran. Dieser eher geringe Effekt des *Mx1-knock-downs* auf den Transport von P75-GFP zur apikalen Oberfläche lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Dynamin-ähnlichen Protein Mx1 möglicherweise um eine ersetzbare Komponente im apikalen Trafficking nicht Lipid-Raft assoziierter Proteine handelt. Außerdem wäre denkbar, dass Mx1 lediglich am Recycling des Neurotrophinrezeptors an der Zelloberfläche und nicht an dessen post-Golgi-Trafficking beteiligt ist.

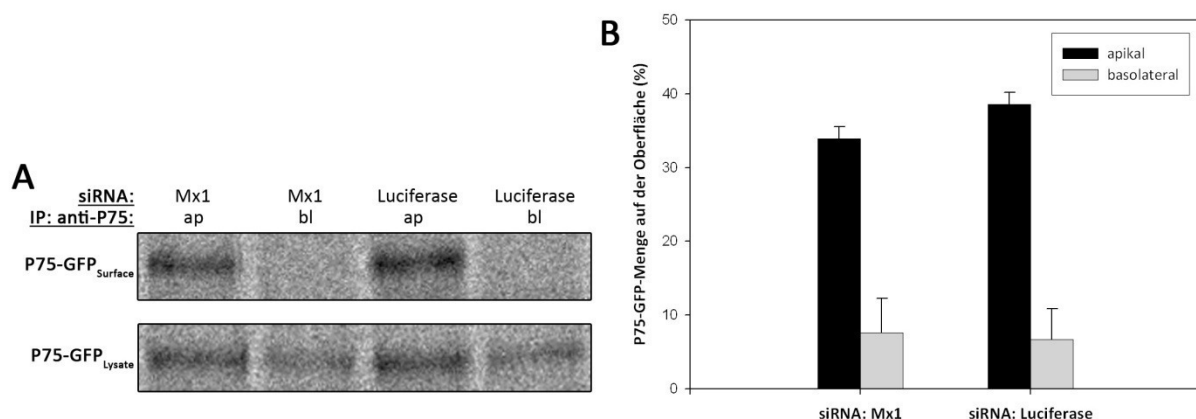


Abbildung 3.17: Oberflächen-Immunopräzipitation von P75-GFP nach Mx1-knock-down

A) In MDCK_{P75-GFP}-Zellen wurde ein *Mx1-knock-down* durchgeführt. Anschließend wurden die auf PET-Filtern gewachsenen Zellen auf die Anwesenheit von metabolisch markiertem P75-GFP auf deren Oberfläche überprüft. Wie der *Phosphorimager-Screen* zeigt, gelangt in den mit Luciferase behandelten Zellen mehr P75-GFP an die apikale Oberfläche als in Zellen mit *Mx1-knock-down* (obere Reihe). Die Menge an P75-GFP an der basolateralen Oberfläche ändert sich kaum. Gleichzeitig wurde untersucht, ob das nicht transportierte P75-GFP folglich im Zytoplasma verblieb (untere Reihe). Dies ist in *Mx1-knock-down*-Zellen in Relation zur P75-GFP-Menge auf der apikalen Oberfläche gesehen der Fall. B) Quantifizierung von 3 Oberflächen-IP-Experimenten wie in A) dargestellt. Im Falle des *Mx1-knock-downs* gelangen nur noch 34 % ($\pm 1,6$ %) des P75-GFPs in die apikale Zytoplasmamembran. Dagegen stehen 39 % ($\pm 1,6$ %) im Kontrollexperiment. a: apikal; bl: basolateral

3.7 Mx1-GFP und Galectin-3 befinden sich gemeinsam in einem Kompartiment im apikalen Zellcortex

Mx1 wurde als eine Komponente von P75-GFP-Vesikeln in der MALDI-TOF-Analyse identifiziert. Da es sich bei P75 um ein vom apikalen Sortierrezeptor **Galectin-3** sortiertes Protein handelt, sollte auch ein Augenmerk auf die mögliche Interaktion von Galectin-3 mit Mx1 geworfen werden. Deshalb wurden MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen an Hand von Immunfluoreszenztechniken auf die Anwesenheit von Galectin-3 geprüft. Wie sich herausstellte liegen Galectin-3 und Mx1-GFP offensichtlich in einem subapikalen Bereich in ein und demselben Kompartiment vor. Wie die TIRF-Aufnahmen bei 90 nm in **Abb. 3.18** zeigen, kommt es zu häufigen Colokalisierungserscheinungen zwischen Galectin-3 und Mx1-GFP.

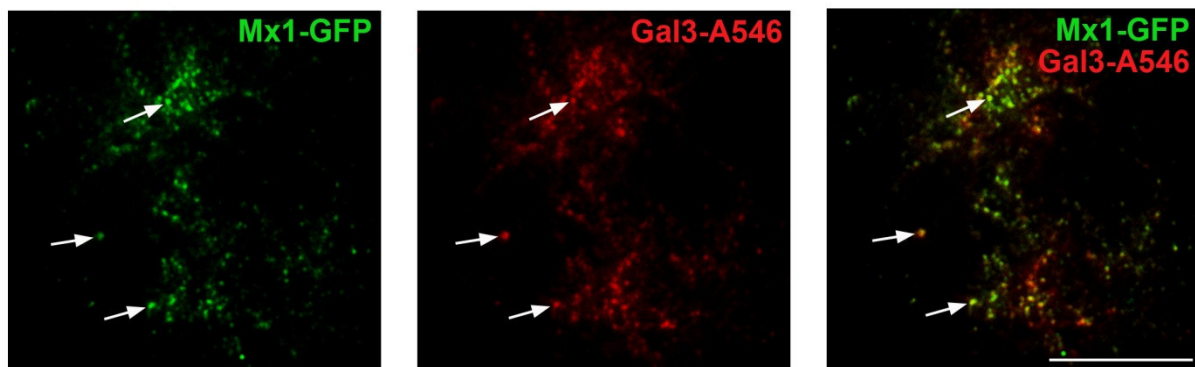


Abbildung 3.18: Colokalisierung von Mx1-GFP und Galectin-3 im apikalen TIRFM

Fünf Tage alte auf PET-Filtern gewachsene MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wurden in PFA (4 %) fixiert und mit α -Galectin-3-Antikörper markiert. Im Anschluss wurden apikale TIRFM-Aufnahmen bei einer Eindringtiefe von 90 nm gemacht. Die Pfeile zeigen auf Strukturen, in denen sowohl der apikale Sortierrezeptor Galectin-3 als auch das Dynamin-ähnliche Mx1-GFP zu finden sind. Maßstab: 10 μ m

Nun sollte festgestellt werden, ob es sich bei der Colokalisation der beiden Proteine um eine direkte Interaktion handelte oder ob die beiden nur im gleichen Kompartiment vorlagen. Zu diesem Zweck wurde eine Co-Immunopräzipitation mit MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen durchgeführt. Diese wurden lysiert und Mx1-GFP mit verschiedenen Antikörpern präzipitiert. Dieser Versuch diente zugleich dafür, geeignete Antikörper zur Mx1-Immunopräzipitation zu finden. Wie sich herausstellte, ließ sich Mx1-GFP sehr gut mit jedem der benutzten Antikörper präzipitieren. Sowohl die beiden Mx1-Antikörper, als auch der GFP-Antikörper sorgten für eine deutliche Anreicherung von Mx1-GFP verglichen mit den Kontrollen ohne Antikörper oder mit einem gegen ein anderes Protein gerichteten Antikörper (hier: α -Tubulin). Auffällig war dabei, dass mit dem mittels α -GFP präzipitierten Mx1-GFP auch ein geringer Anteil an endogenem Mx1 copräzipitiert wurde. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Experimenten

3.8 Einfluss von Mx1 auf die unkonventionelle Sekretion von Galectin-3

Galectin-3 ist ein apikaler Sortierrezeptor, der die Lipid-Raft-unabhängigen Proteine P75 und LPH in die apikale Zytoplasmamembran dirigiert. Über das bislang ungeklärte Schicksal des Lectins nach der Durchführung seiner Sortierarbeit ist bislang nichts bekannt. Fakt ist, dass ein sehr geringer Teil des in der Zelle vorhandenen Galectin-3 in das apikale Medium abgegeben wird (Lindstedt et al., 1993). Darüberhinaus ist bekannt, dass Galectin-3 keine ER-Signalsequenz trägt und die Zelle durch eine sogenannte **unkonventionelle Sekretion** verlässt. In der Arbeitsgruppe um Troy Ott wurde festgestellt, dass auch Mx1 über einen unkonventionellen Sekretionsweg aus der Zelle gelangt (Toyokawa et al., 2007a). Vielmehr wurde über einen regulatorischen Einfluss von Mx1 auf diesen Sekretionsweg spekuliert (Toyokawa et al., 2007b). Um diesen Hinweisen nachzugehen, wurden auf PET-Filtern gewachsene MDCK-WT-Zellen mit siRNA gegen Mx1 behandelt und in deren apikalem und basolateralem Medium die Galectin-3-Menge gemessen. Wie in **Abb. 3.20** zu sehen ist verringert sich nach *Mx1-knock-down* die Galectin-3-Menge im apikalen Medium um ein Vielfaches. In das basolaterale Medium wird Galectin-3 nicht sekretiert. Als Proteinladekontrolle wurde im Western-Blot GAPDH nachgewiesen. Deren Nachweis zeigt außerdem, dass sich im apikalen Medium keine Proteine befanden, die z.B. durch zerstörte Zellen dort hineingelangen könnten. Offensichtlich scheint also Mx1 einen Einfluss auf die unkonventionelle Sekretion von Galectin-3 zu haben.

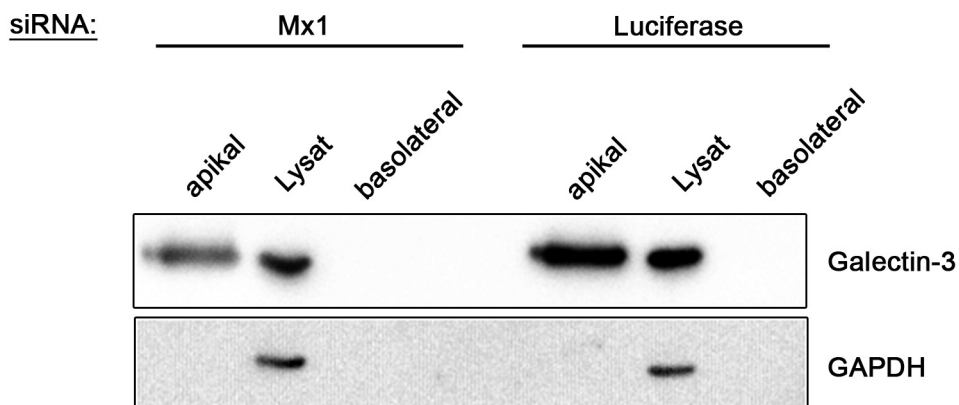


Abbildung 3.20: Mx1 beeinflusst die unkonventionelle Sekretion von Galectin-3

MDCK-WT-Zellen wurden für 6 Tage auf PET-Filtern kultiviert. Währenddessen wurden siRNA-Behandlungen durchgeführt, um die Expression von Mx1 herabzusetzen. Als Kontrolle diente die Transfektion von siRNA gegen das in MDCK-Zellen nicht exprimierte Luciferase-Gen. Anschließend wurde jeweils das apikale und basolaterale Medium entnommen und die darin enthaltenen Proteine mittels TCA gefällt. Außerdem wurden die Zellen in Co-IP-Puffer lysiert und alle Proben im Western-Blot analysiert. In Zellen mit *Mx1-knock-down* wird Galectin-3 zu einem geringeren Anteil ins apikale Medium abgegeben als in den Kontrollzellen. Der Nachweis von GAPDH als zytosolisches Protein schließt unspezifische Sekretion aus, da dieses weder im apikalen noch im basolateralen Medium auftaucht.

3.9 Untersuchung der Sekretion von Galectin-3 im apikalen TIRFM

Als nächstes sollte geklärt werden, ob es möglich wäre den Sekretionsvorgang von Galectin-3 in MDCK-Zellen mikroskopisch zu beobachten. Dieser Vorgang konnte in COS-Zellen bereits eindrucksvoll festgehalten werden (Schneider et al., 2010). In diesem Fall konnten Galectin-3-Vesikel gezeigt werden, die sich der Zelloberfläche dieser unpolaren Affennierenzellen nähern und schließlich in deren Zytoplasmamembran verschmelzen. Auch für P75-GFP wurde dies bereits in unpolaren Zellen gezeigt (Kreitzer et al., 2003). Aus diesem Grund wurde die apikale Seite der stabilen Zelllinie MDCK_{P75-GFP/Gal3-DsRed} und der transient transfizierten Zelllinien MDCK_{P75-GFP/Rab11-DsRed} und MDCK_{Gal3-YFP/Rab11-DsRed} unter dem TIRF-Mikroskop betrachtet. Wie in **Abb. 3.21 A** zu sehen ist, tauchen P75-GFP und sein apikaler Sortierrezeptor Galectin-3 in manchmal **punktförmigen**, manchmal **tubulären Strukturen** in bzw. auf der apikalen Oberfläche der MDCK-Zellen auf. Da es sich bei MDCK-Zellen um Epithelzellen handelt, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den tubulären Strukturen um Mikrovilli handelte. Auf diese Hypothese soll in den hieran anschließenden Abbildungen näher eingegangen werden. Zunächst aber sollte das Kompartiment, in welchem sich P75-GFP an der apikalen Zellseite befindet näher definiert werden. Dafür wurde die stabile Zelllinie MDCK_{P75-GFP} transient mit der fluoreszierenden Variante des Recycling-Endosomen-Marker Rab11-DsRed transfiziert. Wie **Abb. 3.21 B** nahelegt, handelt es sich bei den tubulären Strukturen, in denen sich P75-GFP befindet um Recycling-Endosomen, die den dafür typischen Marker Rab11 tragen. Nun stellte sich die Frage, ob auch Galectin-3 in diesen Recycling-Endosomen vorkommen würde. Dies wurde überprüft, indem eine stabile MDCK_{Gal3-YFP}-Zelllinie transient mit Rab11-DsRed transfiziert wurde. Wie in **Abb. 3.21 C** zu erkennen ist, scheint auch Galectin-3-YFP zumindest teilweise mit Rab11-DsRed colokalisiert vorzuliegen. Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass Galectin-3 gemeinsam mit P75-GFP am apikalen Zellpol in einem endosomalen Kompartiment vorliegt. Bei diesem Kompartiment handelt es sich aufgrund der hohen Rab11-Menge um Recycling-Endosomen. Ein direkter Fusionsvorgang von Galectin-3-haltigen Vesikeln mit der apikalen Membran konnte nicht beobachtet werden, da sich die Oberfläche der MDCK-Zellen als zu uneben erwies und mögliche Fusionsereignisse im Hintergrund verschwanden.

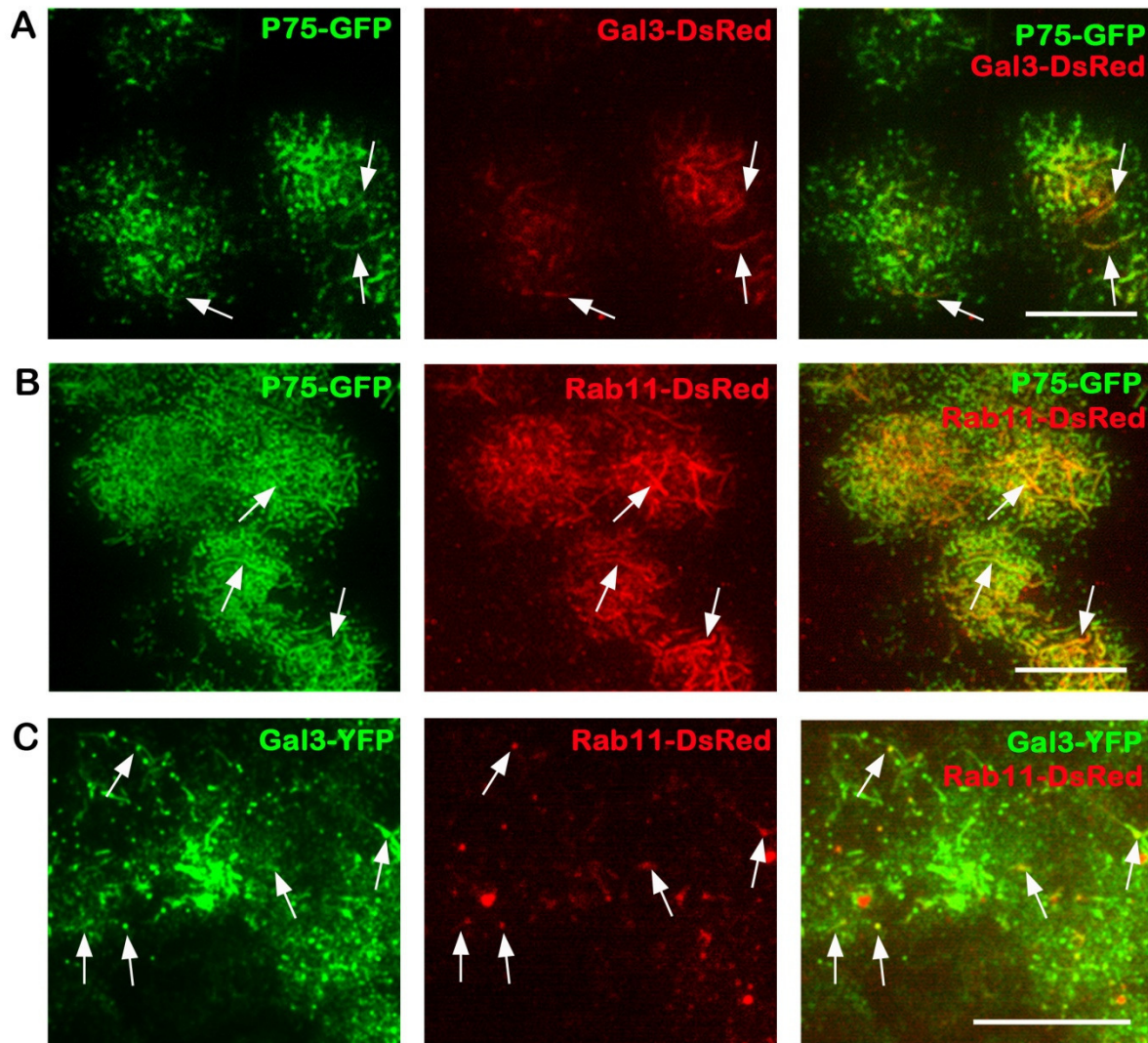


Abbildung 3.21: Lokalisation von Galectin-3 am apikalen Zellpol

Polare, fünf Tage alte MDCK_{P75-GFP}-Zellen oder MDCK_{Gal3-YFP}-Zellen wurden mit Galectin-3-DsRed bzw. Rab11-DsRed cotransfiziert und im apikalen TIRFM bei 90 nm Eindringtiefe betrachtet. A) Es ist zu erkennen, dass P75-GFP und Gal3-DsRed gemeinsam (Pfeile) in einem sowohl vesikulären als auch tubulären Kompartiment knapp unterhalb oder auf der apikalen Oberfläche zu finden sind. B) Dieses tubulo-vesikuläre Netzwerk scheint ein mit für Recycling-Endosomen typisches Rab11-positives Kompartiment zu sein. Es zeigt sich eine deutliche Colokalisierung mit P75-GFP (Pfeile). C) Auch Galectin-3-YFP scheint – zwar nicht im gleichen Maße wie P75-GFP – in diesem Rab11-positiven Kompartiment vorhanden zu sein (Pfeile). Maßstab: 10 µm

Bei den Aufnahmen von MDCK-Zellen im apikalen TIRFM fielen längliche, tubuläre Strukturen auf, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht beobachtet wurden. Diese Strukturen enthielten die Proteine P75-GFP, Rab11-DsRed und zu Teilen Galectin-3-DsRed. Da es sich um Beobachtungen am apikalen Zellpol handelte, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den im Durchschnitt ca. 2,4 µm langen und ca. 0,2 µm breiten Strukturen um Mikrovilli handelte. Diese Vermutung wurde von elektronenmikroskopischen Bildern gestützt, welche eine Immunogoldfärbung von MDCK_{P75-GFP}-

Zellen zeigen (**Abb. 3.22**). Mit Antikörpern gegen P75 ließ sich zeigen, dass dieses sich gehäuft in fingerartigen Gebilden an der Zelloberfläche befand. Dabei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Mikrovilli. Allerdings lassen sich auch intrazellulär Goldpartikel nachweisen.

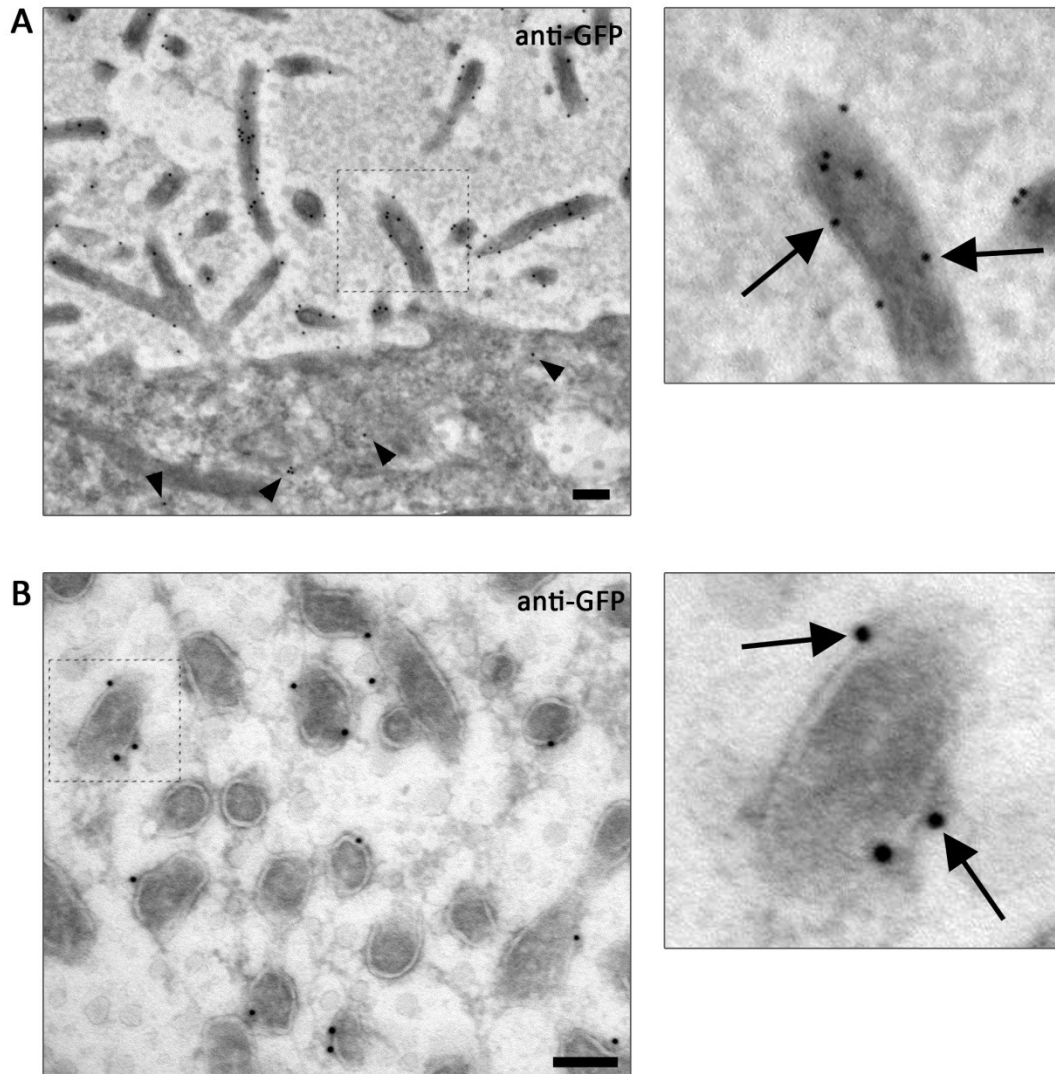


Abbildung 3.22: TEM von MDCK_{P75-GFP}-Zellen

P75-GFP wurde für die Untersuchung im TEM mit 10 nm Goldpartikeln markiert. A) Es zeigte sich, dass P75-GFP in an Mikrovilli erinnernde Strukturen auf der Oberfläche von MDCK-Zellen zu finden ist. Aber auch Strukturen unterhalb der apikalen Zytoplasmamembran wurden angefärbt (Pfeilspitzen). B) Hier ist ein Schnitt durch die röhrenförmigen Strukturen auf der Oberfläche der MDCK-Zellen zu sehen. P75-GFP scheint hier in der Zytoplasmamembran zu sitzen (Pfeile) Maßstab: 100 nm (aufgenommen von Dr. Martina Schmitz, Universität Münster).

Um die Aufklärung der Identität der tubulären Strukturen voranzubringen, wurden weitere Untersuchungen angestellt. In **Abb. 3.23** soll zunächst die drastisch verbesserte Möglichkeit des TIRF-Mikroskops, sehr kleine Strukturen abzubilden, verdeutlicht werden. MDCK_{P75-GFP/Gal3-DsRed}-Zellen wurden jeweils einmal im Epifluoreszenzmodus und einmal im TIRF-Modus betrachtet. Und zwar einmal von der apikalen Seite aus und einmal von der basolateralen. Im basolateralen TIRF ist der Informationsgewinn ebenfalls deutlich, jedoch nicht so stark wie im apikalen TIRF. Dort ist im Epifluoreszenzbild lediglich ein diffuses Leuchten zu sehen, während im TIRF-Bild detaillierte und voneinander abgrenzbare Strukturen auftauchen. Diese zeigen die bereits erwähnte tubuläre Form auf, die es weiter zu untersuchen galt.

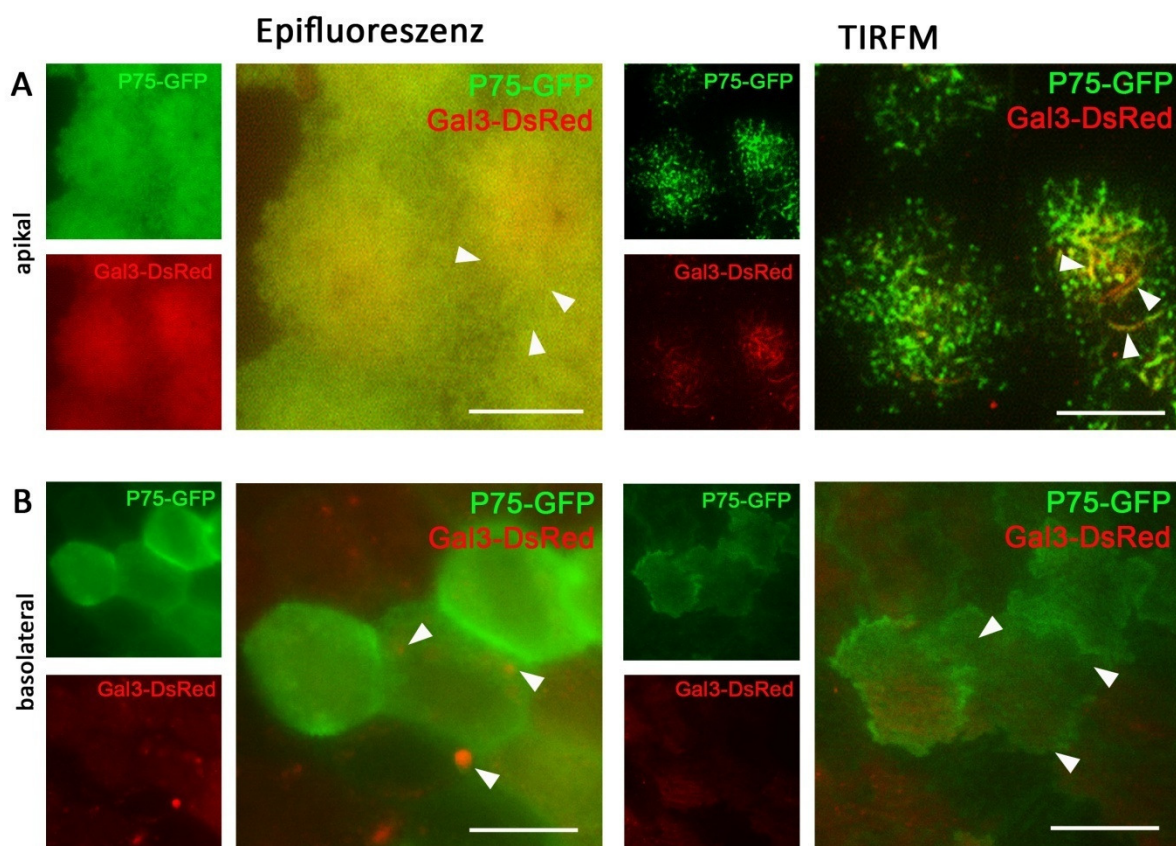


Abbildung 3.23: Vergleich von Epifluoreszenz-, und TIRF-Mikroskopie

Fünf Tage alte, polare MDCK-Zellen wurden entweder von der apikalen oder der basolateralen Seite in der Epifluoreszenz oder im TIRFM beobachtet. TIRF-Aufnahmen zeigen generell eine immense Verbesserung der Detailtreue. Dies macht sich auf der apikalen Seite mit dem Erscheinen distinkter tubulärer und vesikulärer Strukturen bemerkbar (Pfeilspitzen), während in den Epifluoreszenzbildern nur diffuse Farben zu erkennen sind. Auf der basolateralen Seite zeigen sich scharfe Zellgrenzen, die im Gegensatz zur Annahme aus Epifluoreszenzaufnahmen keine geraden Linien beschreiben. In der basolateralen TIRF-Aufnahme wird außerdem die Exklusivität der Fluoreszenz-Excitation auf einen sehr schmalen Bereich in der Nähe des Deckglases deutlich. Während im Epifluoreszenzbild einige große vesikuläre Galectin-3-DsRed-Strukturen zu sehen sind, tauchen diese im TIRF-Bild nicht auf (Pfeilspitzen). Maßstab: 10 µm

Sollte es sich bei den tubulären Strukturen um Mikrovilli handeln, so sollte in diesen ein Actinskelett anfärbbar sein. Also wurden MDCK_{P75-GFP}-Zellen mit dem Actin bindenden **Phalloidin** behandelt. Da dieses Phalloidin an einen im roten Bereich fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt war, konnten damit Aufnahmen im TIRFM gemacht werden (**Abb. 3.24**). Hier zeigte sich, dass Teile der tubulären Strukturen mit Phalloidin-Rot anfärbbar waren, während dies für andere nicht der Fall war (Pfeilspitzen). Des Weiteren wurde durch die Anfärbung des Tubulin-Skeletts eine Struktur auf der Oberfläche der MDCK-Zellen sichtbar, auf die im späteren Verlauf noch weiter eingegangen werden wird (Pfeil). Außerdem wurde klar, dass der Großteil der tubulären P75-GFP-Strukturen nicht mit dem Tubulin-Zytoskelett assoziiert war (Pfeilspitzen).

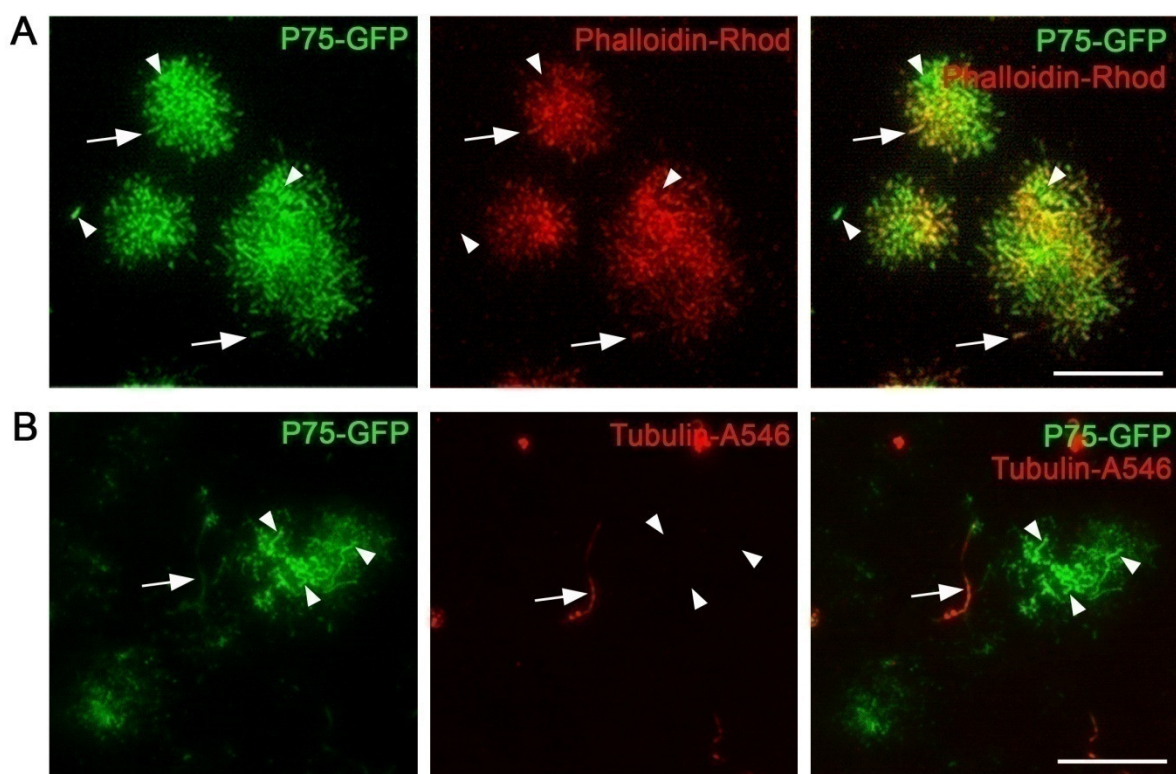


Abbildung 3.24: P75-GFP-Strukturen assoziieren mit dem Actin-Zytoskelett

Fünf Tage alte polare MDCK_{P75-GFP}-Zellen wurden mit Phalloidin-Rhodamin auf Koloration mit dem Actin-Zytoskelett untersucht. Die Aufnahmen in apikalem TIRFM (90 nm) zeigen tubuläre P75-GFP-Strukturen, die teilweise mit dem an Actin bindenden Phalloidin-Rhodamin überlappen (Pfeile) und teilweise davon unabhängige Bereiche markieren (Pfeilspitzen). P75-GFP und α -Tubulin dagegen sind gemeinsam in einem einzelnen, langen tubulären Filament zu finden, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um das Primärzilium handelt (Pfeile). Andere tubuläre P75-GFP-Strukturen wiederum treten unabhängig von α -Tubulin auf (Pfeilspitzen). Maßstab: 10 μ m

Dieser Hinweis, dass es sich offensichtlich nicht nur um Mikrovilli handelte, sondern auch noch andere Möglichkeiten blieben, führte zum nächsten Experiment. In einer Immunfluoreszenzfärbung wurde ausgenutzt, dass Antikörper eine intakte Zytoplasmamembran von MDCK-Zellen nicht passieren können. In diesem Fall wurden MDCK_{P75-GFP}-Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen, ohne die Zellen vorher mit einem Detergens zu permeabilisieren. Somit hatten die zugegebenen Erst- und Zweitantikörper keinen Zugang zu Epitopen innerhalb der Zelle, sondern konnten nur Antigene auf der Zelloberfläche erkennen. Dies führte zu der Erscheinung, dass nicht alle P75-Strukturen auch von einem α -P75-Antikörper erkannt wurden. Wie in **Abb. 3.25** zu sehen ist, tauchen grüne P75-GFP-Strukturen (Pfeile) auf, die nicht im roten α -P75-Signal wiedergegeben werden konnten. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass es sich hierbei um intrazelluläre P75-GFP-Strukturen handelt. Möglicherweise handelt es sich also bei den tubulären Strukturen im apikalen Bereich von MDCK-Zellen nicht ausschließlich um Mikrovilli. Vielmehr lassen die gezeigten Daten die Spekulation zu, dass es sich bei den schlauchartigen Gebilden um ein endosomales Kompartiment handelt, da diese ebenfalls den Recycling-Endosomen-Marker Rab11 enthielten.

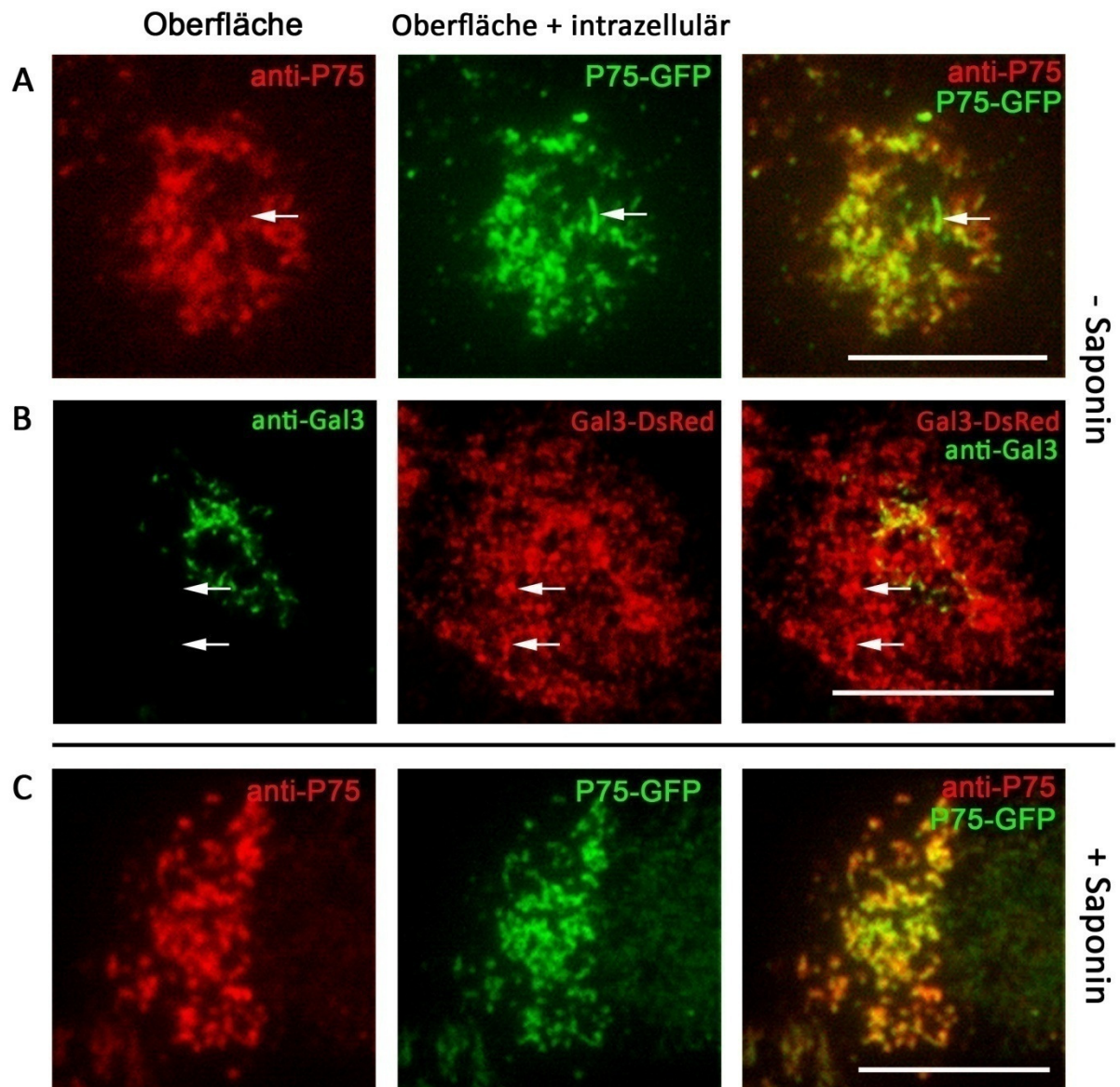


Abbildung 3.25: P75-GFP und Galectin-3-DsRed befinden sich in einem subapikalen Kompartiment dicht unter der Zytoplasmamembran

MDCK_{P75-GFP} und MDCK_{Gal3-DsRed}-Zellen wurden für fünf Tage auf PET-Filtern kultiviert. Anschließend wurden P75-GFP oder Galectin-3-DsRed mittels Immunfluoreszenz in nicht permeabilisierten Zellen markiert. Wie in den Abbildungen A) und B) zu sehen ist markieren die jeweiligen Antikörper nur die auf der Zelloberfläche zugänglichen Proteine, während andere Strukturen, die unterhalb der Zytoplasmamembran liegen, nicht erreicht werden können (Pfeile). C) Werden die Zellen mit Hilfe des Detergens Saponin permeabilisiert, so detektieren die Antikörper auch die Bereiche in der Zelle. α -P75-Signal und P75-GFP-Signal sind identisch. Maßstab: 10 μ m

3.10 Aufnahme von Galectin-3 aus dem apikalen Medium

Wie bereits erwähnt und wie in **Abb. 3.20** zu sehen ist, wird ein gewisser Teil von Galectin-3 aus der Zelle ins apikale Medium abgegeben. Von Galectin-1 (Fajka-Boja et al., 2008) und Galectin-9 (Mishra et al., 2010) ist bekannt, dass diese extrazellulär an diverse Liganden binden. Dies ist für Galectin-3 bisher noch weitestgehend unbekannt. Außerdem war ungeklärt, ob sekretiertes Galectin-3 auch wieder in die Zelle eingeschleust werden könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden einige Experimente zur Aufnahme von Galectin-3 aus dem apikalen Medium durchgeführt.

3.10.1 Blockierung der Endozytose von Galectin-3 durch verschiedene Endozytosehemmer

In MDCK-Zellen bestehen mehrere Endozytosemöglichkeiten. Zum einen die **Clathrin-abhängige Endozytose** über das Adapterprotein AP-2. Zum anderen eine **Lipid-Raft-abhängige Endozytose** über sogenannte Caveolae mit dem typischen Markerprotein Caveolin oder die sehr ähnlichen Flotillin-Strukturen. Verschiedene Chemikalien machen es möglich, speziell den einen oder den anderen Endozytosemechanismus zu blockieren. So inhibiert **Chlorpromazin** die Clathrin-abhängige Endozytose, während das aus dem Bakterium *Streptomyces filipinensis* gewonnene **Filipin** über seine Bindung an Cholesterol die Lipid-Raft-abhängige Endozytose hemmt. Daher wurden MDCK-WT-Zellen mit jeweils einer der beiden Chemikalien behandelt und anschließend beobachtet, ob das von außen zugegebene rekombinante Galectin-3 noch in die Zelle gelangen sollte. **Abb. 3.26** beweist, dass das rekombinante humane Galectin-3 (hGal3) nur in nicht behandelten Zellen (C) oder in mit Chlorpromazin behandelten Zellen (CPZ) Zugang in die Zellen erlangte. Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass mit Filipin behandelte Zellen nicht dazu in der Lage waren, rekombinantes Galectin-3 aufzunehmen. Die tiefgestellten Zahlen verweisen auf die Dauer (in min) der Inkubation der Zellen bei einer Endozytose permissiven Temperatur von 37°C. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass Galectin-3 durch einen Lipid-Raft-abhängigen Endozytosemechanismus in die Zelle aufgenommen wird. Möglicherweise bindet Galectin-3 im apikalen Medium an ein Glykoprotein oder ein Glykolipid, welches in einem Lipid-Raft-abhängigen Mechanismus in die Zelle aufgenommen wird. Im Western-Blot in **Abb. 3.26** kann man zwischen endogenem caninen Galectin-3 (cGal3) und dem etwas kleineren rekombinanten humanen Galectin-3 (hGal3) unterscheiden. Als Proteinladekontrolle wurde α -Tubulin detektiert.

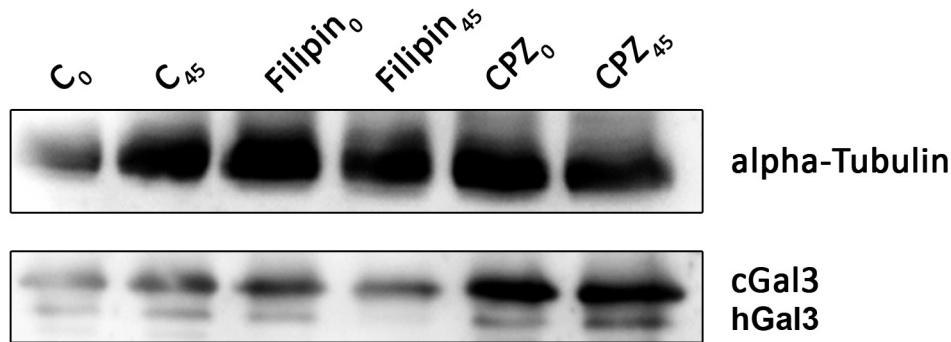


Abbildung 3.26: Aufnahme von rekombinantem humanem Galectin-3 in MDCK-Zellen

Polare MDCK-Zellen wurden mit Inhibitoren für den Lipid-Raft- (Filipin) oder den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg (Chlorpromazin) behandelt und daraufhin auf die Aufnahme von durch außen zugegebenes humanes Galectin-3 untersucht. Dieses wurde für 0 min oder für 45 min bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden diese gewaschen, lysiert und im Western-Blot auf die Anwesenheit von humanem Galectin-3 begutachtet. In Kontrollzellen und in mit CPZ behandelten Zellen wurde humanes Galectin-3 aufgenommen, während dies für mit Filipin behandelte Zellen nicht galt. C=Kontrolle, CPZ=Chlorpromazin, cGal3=canines Galectin-3, hGal3=humanes Galectin-3

3.10.2 Beobachtungen zur Aufnahme von Galectin-3-Alexa633 im apikalen TIRFM

In **Abb. 3.26** wurde bereits dargestellt, dass bei der Endozytose von Galectin-3 Detergens resistente Membranmikrodomänen eine Rolle spielen. Dieser Beobachtung sollte auch lebendzellmikroskopisch auf den Grund gegangen werden. Zu diesem Zweck wurden MDCK-Zelllinien hergestellt, die entweder die Lipid-Raft-Marker **Caveolin-1** oder **Flotillin-1** in einer fluoreszierenden Variante gemeinsam mit Galectin-3-DsRed oder eine fluoreszierende **Clathrin**-Version gemeinsam mit Galectin-3-DsRed exprimierten. So entstanden die Zelllinien MDCK_{Gal3-DsRed/Cav1-YFP}, MDCK_{Gal3-DsRed/Flot1-GFP} und MDCK_{Gal3-DsRed/Clathrin-CFP}. Zu diesen Zellen wurde bei 4°C rekombinantes humanes **Galectin-3-Alexa633** gegeben. Nach einer Temperaturänderung auf 37°C wurde das rekombinante Galectin-3 in die Zellen aufgenommen. Unter dem TIRF-Mikroskop konnte dann untersucht werden, in welchen Membrandomänen der apikalen Zytoplasmamembran dieser Vorgang stattfand. Wie in **Abb. 3.27** zu erkennen ist, findet bereits die Anlagerung von Galectin-3-Alexa633 an die Zelle in Caveolin-1 und Flotillin-1 tragenden Membrandomänen – also Lipid-Rafts – statt. Zwischen Galectin3-Alexa633 und Clathrin-CFP wiederum findet keine Assoziation statt. Die Interaktionshäufigkeit von Caveolin-1-GFP oder Flotillin-1-YFP mit Galectin-3-Alexa633 wird 5 min nach der Temperaturänderung auf einen Endozytose permissiven Wert sogar noch erhöht, während es nach wie vor keine Anzeichen einer Clathrin-abhängigen Endozytose von Galectin-3-Alexa633 gibt. 10 Minuten nach Beginn der Endozytose nimmt der Anteil an Galectin-3-Alexa633-Strukturen, die mit den Lipid-Raft-Markern

colokalisieren wieder ab (**Abb. 3.28**). Dies deutet darauf hin, dass die von außen zugegebenen Galectin-3-Moleküle nun vollständig aufgenommen wurden. Auch nach 60 Minuten ist nur noch eine geringe Interaktion messbar. **Abb. 3.26** zeigt außerdem eine mit zunehmender Zeit stärker werdende Signal-Übereinstimmung des von außen zugegebenen Galectin-3-Alexa633 mit dem größtenteils intrazellulären Galectin-3-DsRed. Aus dieser Tatsache lässt sich schließen, dass das rekombinante Galectin-3-Alexa633 tatsächlich in die Zelle gelangt. Zusammengefasst sind diese gemachten Beobachtungen ein weiterer Hinweis auf die Clathrin unabhängige Aufnahme von Galectin-3 in die Zelle, die im Gegensatz zu dessen Rolle im Lipid-Raft-unabhängigen sekretorischen Weg steht.

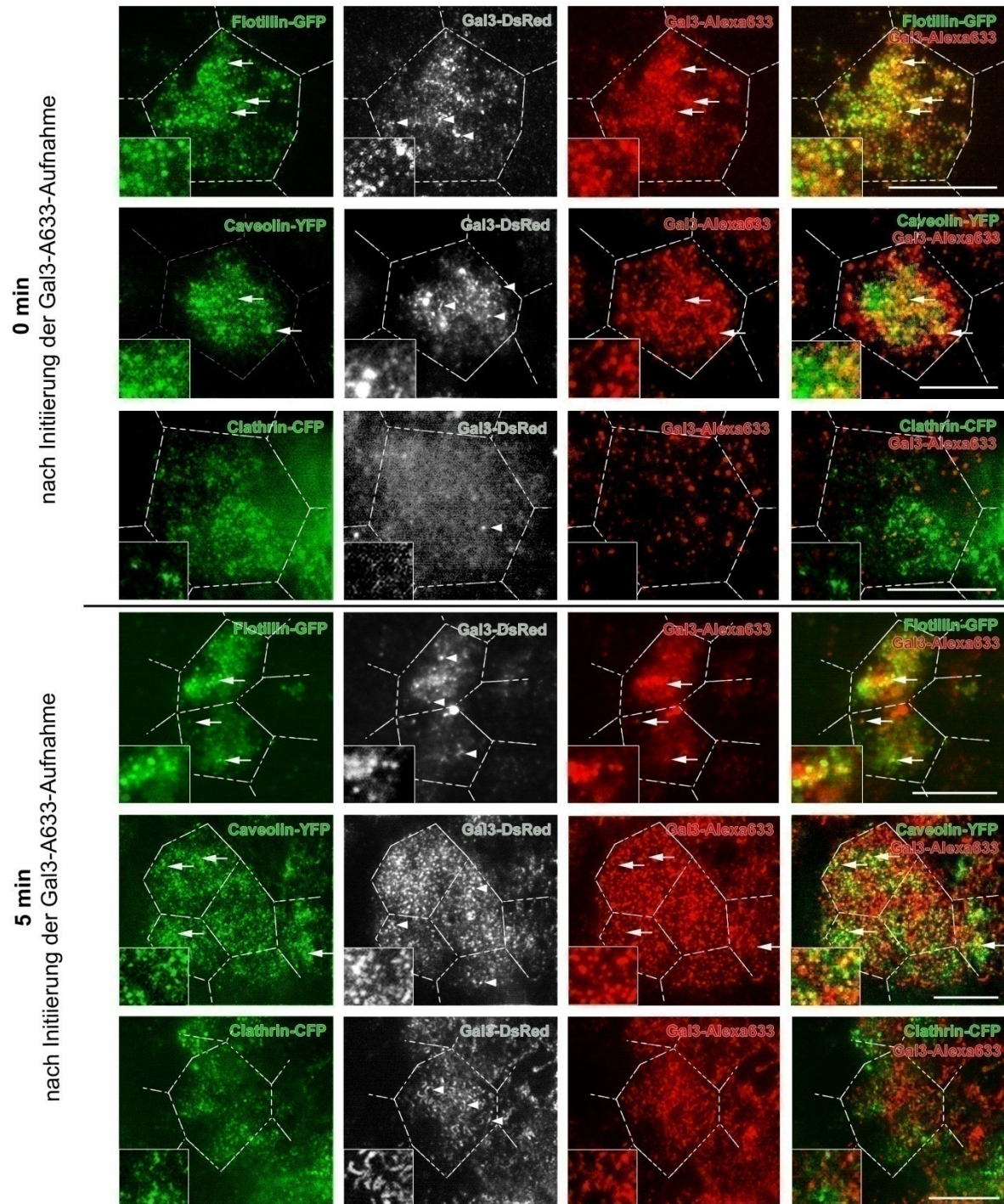


Abbildung 3.27: Aufnahme von rekombinantem humanem Galectin-3 in MDCK-Zellen in der apikalen TIRF-Mikroskopie

Polare auf PET-Filtern gewachsene MDCK_{Gal3-DsRed/Cav1-YFP}, MDCK_{Gal3-DsRed/Flot1-GFP} und MDCK_{Gal3-DsRed/Clathrin-CFP} – Zellen wurden bei 4°C mit humanem Galectin-3-Alexa633 auf der apikalen Seite inkubiert und 0, 5, 10 und 60 min nach Start der Endozytose bei 37°C im apikalen TIRFM betrachtet. Zum Zeitpunkt 0 min und 5 min wird deutlich, dass große Mengen von Galectin-3-Alexa633 mit den Lipid-Raft-Markern Flotillin und Caveolin assoziiert sind, nicht aber mit Clathrin. Maßstab: 10 µm

Abb. 3.28 B zeigt die Aufnahme einer lebenden MDCK_{Gal3-DsRed/Cav1-YFP}-Zelle, in der gerade ein Aufnahmeprozess von Galectin-3-DsRed in einer Caveolin-1-YFP-positiven Struktur stattfindet. Innerhalb von etwa 1,5 Minuten verschwindet die beide Marker enthaltende Struktur im Zellinneren.

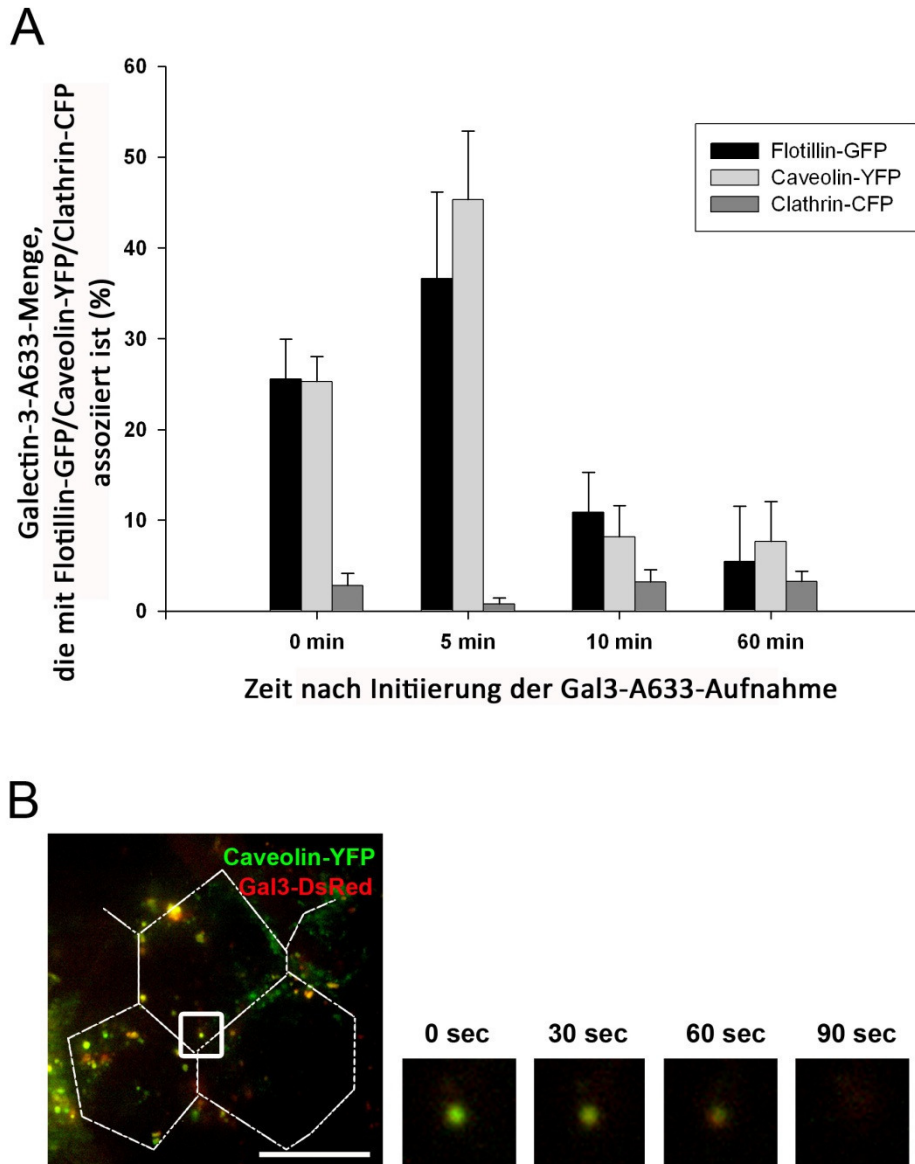


Abbildung 3.28: Aufnahme von rekombinantem humanem Galectin-3 in MDCK-Zellen in der apikalen TIRF-Mikroskopie – Quantifizierung

A) Die zu Abb. 3.27 gehörige Quantifizierung zeigt eine Abnahme der Assoziation von Galectin-3-Alexa633 mit Caveolin und Flotillin 10 min nach Beginn der Aufnahme, die sich nach einer Stunde noch weiter abschwächt. Zu keinem Zeitpunkt ist Galectin-3-Alexa633 jedoch mit Clathrin positiven Strukturen zu sehen. B) In dieser Lebendzell-Aufnahme einer MDCK_{Gal3-DsRed/Cav1-YFP}-Zelle ist das Verschwinden eines für beide Proteine positiven Vesikels ins Zellinnere festgehalten worden. Dies könnte ein Endozytoseereignis darstellen. Maßstab: 10 μ m

3.11 Transportprozesse im Primärzilium

Behandelt man polare MDCK-Zellen in der Immunfluoreszenz mit einem α -Tubulin-Antikörper, so erhält man unter dem TIRF-Mikroskop eine prominente Anfärbung einer einzelnen Struktur pro Zelle, die aus dieser hinausragt. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um das **Primärzilium**. MDCK-Zellen entwickeln dieses im Laufe ihrer Polarisierung und können damit mechanische Reize detektieren. Weitere Funktionen dieses Zellfortsatzes liegen bisher weitestgehend im Verborgenen.

Abb. 3.29 zeigt eine 3D-Rekonstruktion eines im Epifluoreszenzmikroskop aufgenommenen z-Stapels von MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen, die mit einem Antikörper gegen α -Tubulin gefärbt wurden. Es wird deutlich, dass die α -Tubulin enthaltenden Primärzilien aus den Zellen herausragen, und zwar genau ein Zilium pro Zelle.

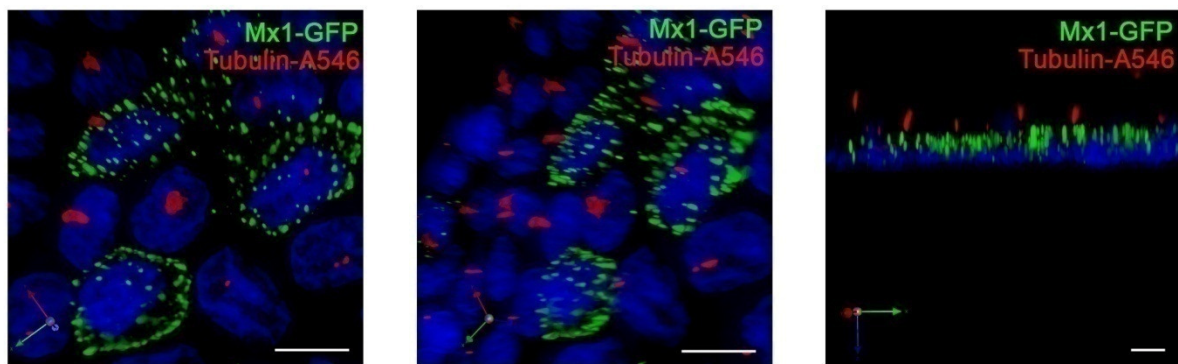


Abbildung 3.29: 3D-Rekonstruktion von Mx1-GFP und Tubulin-A546

Von polaren MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen, mit welchen eine Immunfluoreszenzfärbung gegen α -Tubulin durchgeführt wurde, wurden z-Stapel-Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen und anschließend mit Hilfe der Volocity-Software dekonvuliert um zu einer dreidimensionalen Rekonstruktion zusammengesetzt zu werden. Das erste Bild zeigt eine Aufsicht von oben auf die Zellen. Im zweiten Bild wurde der Blickwinkel um ca. 45° zur Seite gedreht. Das Bild ganz rechts stellt einen Querschnitt durch das Zell-Monolayer dar. Mit höchster Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei den mit anti-Tubulin gefärbten Strukturen, die offensichtlich nur einmal pro Zelle vorkommen und deutlich aus dieser herausragen, um Primärzilien. Mx1-GFP dagegen befinden sich unter der apikalen Oberfläche. Die mit Hoechst gefärbten Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstab: 10 μ m

In einem weiteren Versuch wurde die Länge der Zilien im Verlauf der Polarisierung der MDCK-Zellen untersucht. Hier stellte sich heraus, dass die Durchschnittslänge der Primärzilien mit dem Alter der Zellen – sprich mit deren Polarisationsgrad – zunahm. Während die Zilien 4 Tage nach der Ausplattierung der Zellen im Durchschnitt 2,7 μ m (+/-1,2 μ m) maßen, wuchsen sie über Tag 5 bis Tag 6 auf 3,4 (+/-1,8 μ m) bzw. 5,2 μ m (+/-1,8 μ m) an.

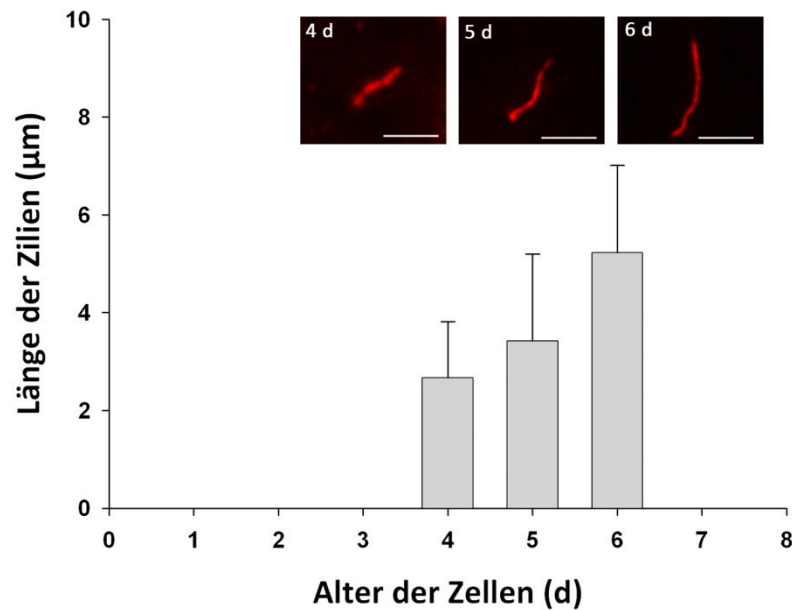


Abbildung 3.30: Zilienlänge im Verlauf der Polarisation

MDCK-WT-Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum auf PET-Filtern kultiviert und anschließend in einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem α -Tubulin-Antikörper behandelt. Die Länge der daraufhin sichtbar gewordenen Primärzilien wurde mit der Leica-Software LAS-AF gemessen und ein Durchschnittswert errechnet. Maßstab: 2 μ m

Diese gewonnenen Erkenntnisse wurden von Nutzen, als in apikalen TIRF-Aufnahmen von MDCK_{P75}-GFP/Gal3-DsRed⁺-Zellen Vesikel auftauchten, in denen P75-GFP und Galectin-3-DsRed gemeinsam durch an Primärzilien erinnernde Strukturen wanderten. Wie eine Zeitaufnahme von diesen Zellen in **Abb. 3.31 A** zeigt, kommt es zu einer Hin- und Her-Bewegung zweier P75-GFP und Galectin-3-DsRed tragender Vesikel entlang eines Primärziliums. Die zunächst von rechts nach links gewandte Bewegung schlägt auf halbem Weg in die entgegengesetzte Richtung um. Auch in **Abb. 3.31 B** wandert ein P75-GFP/Gal3-DsRed-Vesikel entlang eines Primärziliums. In diesem Fall aber nur in einer Richtung, hier von oben nach unten. Über den Zweck dieses Vorgangs lässt sich spekulieren. Möglicherweise kommt es im Primärzilium zu Exocytosevorgängen, durch die Galectin-3 die Zelle verlässt.

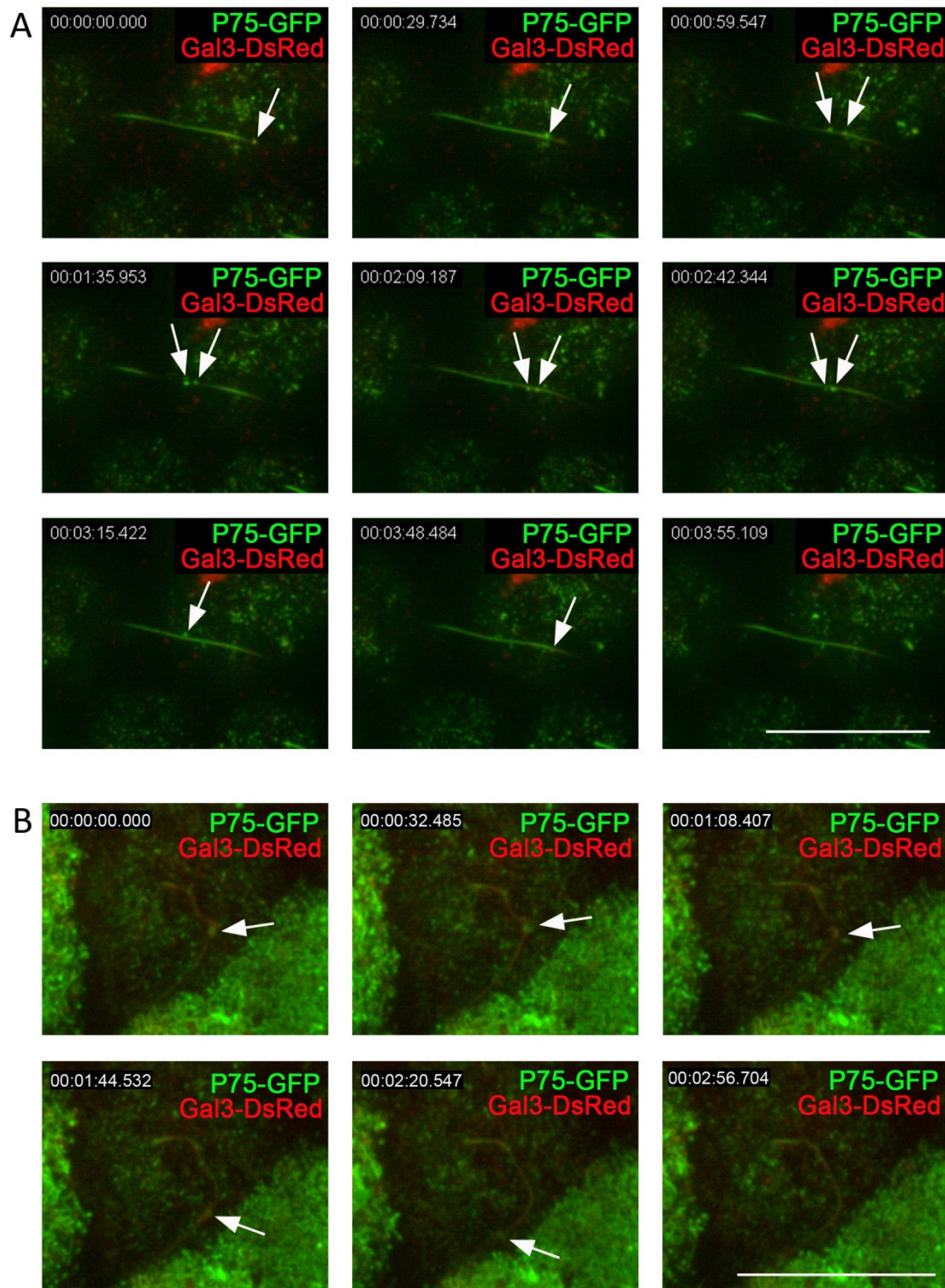


Abbildung 3.31: Vesikulärer Proteintransport im Primärzillium

Fünf Tage alte polare MDCK_{P75-GFP, Gal3-DsRed}-Zellen wurden auf Filtern kultiviert und bei 37°C lebend im apikalen TIRFM betrachtet. Die Abbildungen zeigen zwei Bildfolgen zu den angegebenen Zeitpunkten. A) Man kann den Transport von zwei vesikulären Strukturen entlang eines mutmaßlichen Primärzilliums erkennen, die für beide Proteinmarker positiv sind (Pfeile). Beide Strukturen wechseln im Laufe der Zeit die Laufrichtung. Gesamtdauer: 3,55 min B) Hier ist ein P75-GFP/Gal3-DsRed-Vesikel zu sehen, welches das Primärzillium von oben nach unten durchläuft (Pfeil). Gesamtdauer: 2,56 min. Maßstab: 10 µm

3.12 Galectin-3 in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen

3.12.1 Untersuchung der Galectin-3-Expression in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Galectin-3 wird neben seiner Funktion im apikalen Proteinsorting eine tragende Rolle in der Entwicklung diverser Tumorarten zugesprochen. So gibt es z. B. eine positive Korrelation zwischen der Progression von Schilddrüsen- oder Darmkarzinomen und der Galectin-3-Expression (Takenaka et al., 2004). Auf dieses Wissen aufbauend sollte nun festgestellt werden, ob sich die Galectin-3-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen ebenfalls ändern würde. Dafür wurden Gewebeteile aus gesundem (Normal), entartetem (Tumor) Gewebe und einem Übergangsbereich (Übergang) aus 16 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom lysiert und im Western-Blot-Verfahren auf die Expressionsrate von Galectin-3 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Galectin-3 bei einem Großteil der Patienten im Tumorgewebe stärker exprimiert wurde, als im Übergang oder dem Normalgewebe. Als Referenzproteine dienten α -Tubulin und GAPDH (**Abb. 3.32 A**). Im Gegensatz zu Galectin-3 blieb deren Expressionsrate im Vergleich der verschiedenen Gewebe auf einem ähnlichen Level. Die Quantifizierung der Western-Blot-Daten aller Patienten erfolgte durch den Vergleich densitometrischer Messungen und zeigt eine tendenzielle Zunahme der Galectin-3-Menge über das Übergangsgewebe zum Tumorgewebe (**Abb.3.33**). Diese Daten deuten auf einen Zusammenhang zwischen einer starken Expression von Galectin-3 und dem Vorhandensein eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms hin.

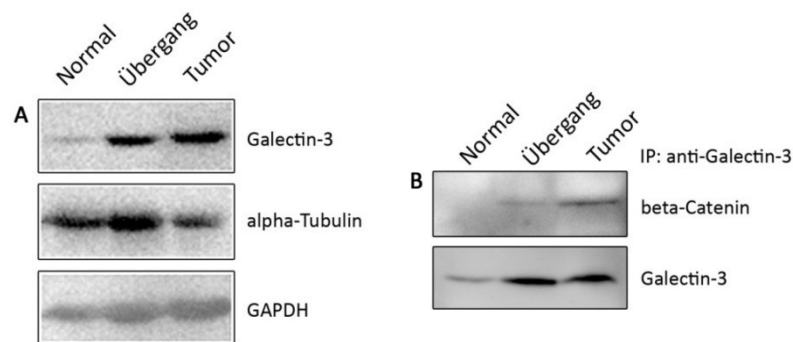


Abbildung 3.32 Galectin-3 wird in klarzelligen Nierenzellkarzinomen überexprimiert und interagiert mit β -Catenin

A) Die Abbildung zeigt das Expressionsniveau von Galectin-3 eines Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom im Western-Blot. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg im Übergangs- und Tumorgewebe. Als Ladekontrollen wurden α -Tubulin und GAPDH verwendet. B) Die in Abbildung A verwendeten Gewebelysate wurden außerdem für Co-IP-Studien verwendet. Hier zeigte sich, dass sich mit Galectin-3 auch β -Catenin copräzipitieren ließ.

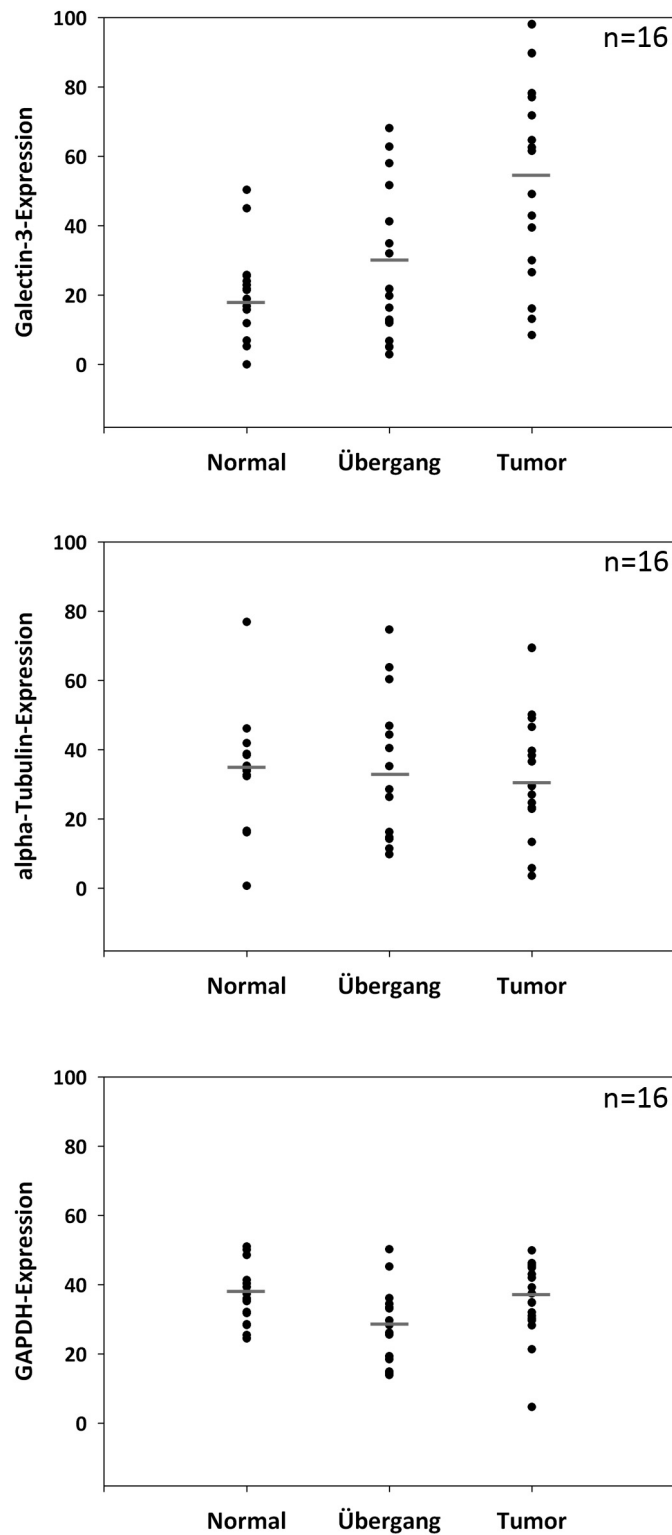


Abbildung 3.33: Quantifizierung der Expressionslevel diverser Proteine in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Quantifizierung der in Abb. 3.32 A gezeigten Expressionslevel von 16 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom. Während die GAPDH- und α -Tubulin-Menge in allen Geweben um einen ähnlichen Mittelwert schwanken, erhöht sich die Galectin-3-Menge im Übergangs- und Tumorgewebe kontinuierlich.

3.12.2 Co-Immunopräzipitation von Galectin-3 in humanen klarzelligen Nierenzellkarzinomen

β -Catenin ist ein wichtiger Bestandteil im **Wnt-Signalweg**. Es kann dabei im Zellkern an den Transkriptionsfaktor **TCF** (T-Zell Faktor) binden und somit für die Aktivierung verschiedener Gene wie *c-myc* oder *cyclin D1* sorgen, welche wiederum eine wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren spielen. Shimura *et al.* berichteten bereits von einer Interaktion zwischen β -Catenin und Galectin-3 in diversen Tumorzelllinien (Shimura et al., 2004). Deshalb sollten die Lysate der verschiedenen Nierenproben neben der Untersuchung der Galectin-3-Expression auch auf eine evtl. Co-Immunopräzipitation mit β -Catenin geprüft werden. Hierzu wurden 9 ml des jeweiligen Nierenlysates mit α -Galectin-3-Antikörper inkubiert und die sich ergebenden Proteinaggregate mittels PAS präzipitiert und im Western-Blot analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass sich Galectin-3 aus jedem der drei Gewebetypen „Normal, Übergang und Tumor“ sehr gut präzipitieren ließ, wobei sich im Übergang und im Tumor die vermehrte Expression von Galectin-3 widerspiegelt. Durch das stärkere Vorkommen von Galectin-3 im Übergang und Tumor kann dieses auch vermehrt präzipitiert werden. Auffällig ist dabei die Co-Präzipitation von **β -Catenin** im Übergang- und Tumorgewebe. Offensichtlich gibt es eine Interaktion von Galectin-3 und β -Catenin in tumorösen oder sich im Transit befindenden Geweben. Über die Möglichkeit, dass eine Galectin-3- β -Catenin-Interaktion erst in entarteten Zellen auftritt und sozusagen eine Ursache der unregelmäßigen Proliferation ist, kann nur spekuliert werden, da die präzipitierte Menge an Galectin-3 im Normalgewebe weitaus geringer ist, als in den anderen Geweben und somit möglicherweise β -Catenin in einer nicht mehr detektierbaren Menge co-präzipitiert wird. Es scheint aber ebenfalls der Fall zu sein, dass trotz vergleichbarer Menge an Galectin-3 im Übergang und Tumor mehr β -Catenin im Tumorgewebe co-präzipitiert. Dies deutet wiederum auf eine Korrelation der Galectin-3- β -Catenin-Interaktion mit dem Grad der Entartung des entsprechenden Gewebes hin. Bei diesen Daten handelt es sich um erste vorläufige Ergebnisse eines einzelnen Patienten, die einer statistischen Untermauerung bedürfen.

4 Diskussion

Polare Epithelzellen lassen sich hinsichtlich ihrer Zytoplasmamembran in einen apikalen und einen basolateralen Teil untergliedern. Beide Membranbereiche werden von spezialisierten Transportwegen mit Proteinen und Lipiden versorgt. Diese tragen für ihre korrekte Sortierung topogene Signale in ihrer Struktur oder ihren posttranslationalen Modifikationen. Ein fehlerhafter intrazellulärer Proteintransport kann zu zahlreichen Krankheitssymptomen führen (Aridor and Hannan, 2000; Aridor and Hannan, 2002; Laiko et al., 2010).

Um den verschiedenen bearbeiteten Teilbereichen der vorliegenden Arbeit gerecht zu werden, gliedert sich der Diskussionsteil in drei separate Abschnitte. In **Abschnitt 4.1** werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum Transport apikaler Modelproteine in ALPK1-Knockout-Mäusen diskutiert. **Abschnitt 4.2** beschäftigt sich mit dem Einordnen der erhaltenen Erkenntnisse zum Thema des Lipid-Raft-unabhängigen apikalen Proteintransports in MDCK-Zellen. Im Detail geht es um den Einfluss von Mx1 auf diesen Galectin-3-abhängigen Transportweg und die unkonventionelle Sekretion von Galectin-3. In **Abschnitt 4.3** wird die Rolle von Galectin-3 bei der Entstehung klarzelliger Nierenzellkarzinome erörtert.

4.1 Trafficking apikaler Markerproteine in ALPK1-Knockout-Mäusen

Alphakinasen wie die ALPK1 phosphorylieren ihr Substrat innerhalb α -helikaler Strukturen, worauf ihre Bezeichnung zurückzuführen ist (Ryazanov et al., 1999). In MDCK-Zellen wurde in Erfahrung gebracht, dass die ALPK1 das Motorprotein Myosin-1 phosphoryliert und damit am Transport des Lipid-Raft-Proteins SI beteiligt ist. Wird die ALPK1-Expression per siRNA-*knock-down* herabgesetzt, so gelangt die SI nicht mehr effektiv in die apikale Zytoplasmamembran (Heine et al., 2005). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die ALPK1 ein wesentlicher Bestandteil des Lipid-Raft-abhängigen apikalen Transportweges ist.

Diese in Zellkultur gemachten Beobachtungen sollten nun in einem kompletten Organismus untersucht werden. Also wurden ALPK1-Knockout-Mäuse hinsichtlich ihrer Verteilung von apikalen Markerproteinen im Dünndarm untersucht. Als Referenz dienten die nicht in Lipid-Rafts vorkommende LPH und die beiden Lipid-Raft-Marker DPP IV und SI. Die Dünndarm-Präparate wurden mit geeigneten Antikörpern markiert und im KLSM betrachtet. Die gemachten Aufnahmen wurden im Anschluss mit der Leica-Software LCS quantifiziert.

So stellte sich in den ALPK1-Knockout-Mäusen ein Transport-Defizit der Lipid-Raft-Marker DPP IV und SI heraus. DPP IV wurde im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nur noch zu 40 % (± 10 %) in den Bürstensaum, also die apikale Zytoplasmamembran, transportiert. Im Fall der SI wurden noch 60 % (± 20 %) korrekt transportiert. Die nicht in Lipid-Rafts anwesende LPH wiederum gelangte zu 91 % (± 29 %) in den Bürstensaum (**Abb. 3.1**). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die ALPK1 auch im lebenden Organismus hauptsächlich im Lipid-Raft-abhängigen apikalen Transportweg eine Rolle spielt, während der Lipid-Raft-unabhängige Weg weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Dabei fällt auf, dass im Falle der DPP IV im Mikroskop eine deutliche Retention im ER zu erkennen ist (**Abb. 3.1**). Vermutlich werden die DPP IV enthaltenden Vesikel durch die fehlende Phosphorylierung des für den Transport benötigten Motorproteins Myosin-1 nicht zur apikalen Zytoplasmamembran geleitet (**Abb. 4.1**). Ein ähnlicher aber nicht so deutlicher Effekt zeigt sich beim Transport der SI. Allerdings wird hier das Zurückhalten des Proteins im Zellinneren nicht so deutlich wie bei der DPP IV. Möglicherweise besteht für den Transport der Saccharase-Isomaltase noch ein alternativer Transportweg. Dies würde auch eine Erklärung für die relativ hohe Standardabweichung liefern.

Heine *et al.* konnten die ALPK1 ausschließlich in Lipid-Raft assoziierten Vesikeln detektieren, nicht in LPH-Vesikeln, also Lipid-Raft-unabhängigen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass auch in der ALPK1-Knockout-Maus nur eine geringe Beeinflussung des LPH-Transports in die apikale Zytoplasmamembran besteht. In dieser Hinsicht wäre ein Tierexperiment interessant, in dem verschiedene Zucker-Diäten verabreicht werden. Sollte der Transport der Saccharase-Isomaltase, die Saccharose und Maltose spaltet, durch den Knockout der ALPK1 in den Bürstensaum gestört sein, so sollten durch die Gabe eines Saccharose- bzw. Maltose reichen Futters Verdauungsstörungen entstehen. Im Gegensatz dazu sollte eine laktosereiche Diät keine derartigen Symptome hervorrufen, da der Laktase-Phlorizin-Hydrolase-Transport in der ALPK1-Knockout-Maus unbeeinflusst bleibt.

Alternativ zu dieser Diskussion sollte erwähnt werden, dass DPP IV neben seiner Lipid-Raft-Assoziation noch ein weiteres, bislang unbekanntes Sortiercharakteristikum für die apikale Zytoplasmamembran aufweist (Slimane et al., 2001). Dieser zusätzliche Sortierweg scheint jedoch im Darm der Maus nicht besonders stark ausgeprägt zu sein, bzw. ebenfalls von Myosin-1 abzuhängen, da im Vergleich zum Transport der SI sogar eine größere Beeinträchtigung vorliegt.

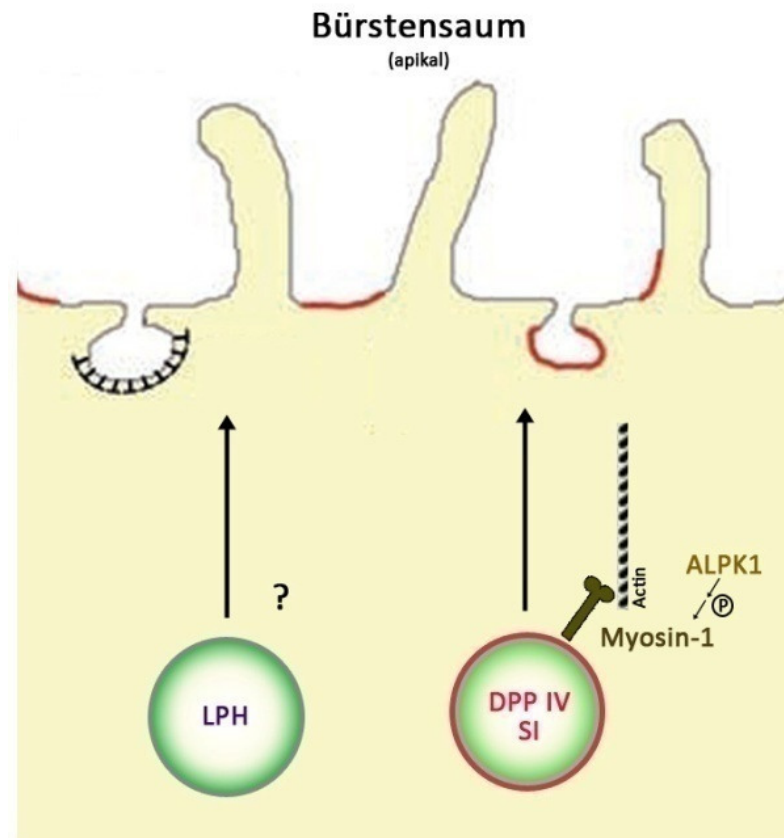


Abbildung 4.1: ALPK1 im Lipid-Raft-abhängigen apikalen Proteintransport

Die ALPK1 phosphoryliert das im apikalen Transport der Lipid-Raft-Marker SI und DPP IV involvierte Myosin-1 und nimmt somit indirekt Einfluss auf deren korrekte Lokalisation in der apikalen Zytoplasmamembran. Rot: Lipid-Rafts (abgeändert nach (Delacour and Jacob, 2006)).

4.2 Galectin-3 und der Lipid-Raft-unabhängige apikale Proteintransportweg

4.2.1 Entdeckung von Mx1 im Lipid-Raft-unabhängigen Proteintransportweg

In diesem Teil der Arbeit ging es um die Erweiterung des Verständnisses zum apikalen nicht mit Lipid-Rafts assoziierten Proteintransport in MDCK-Zellen. Dieser Sortierprozess findet in einem *post*-Golgi-Kompartiment statt. Auf welche Weise sich daraufhin distinkte Transportvesikel von diesem Kompartiment abschnüren und zur apikalen Zytoplasmamembran transportiert werden, sollte u. a. im Verlauf dieser Arbeit geklärt werden. Zunächst standen zwei Theorien zur Diskussion, auf welche Art sich diese Galectin-3-Vesikel bilden könnten. Zum einen wäre es vorstellbar, dass sich Vesikel nach dem klassischen Vorbild mit Hilfe von Mantelproteinen bilden könnten. Zum anderen besteht die Möglichkeit eines alleine auf der Bildung der hochmolekularen Komplexe basierenden Modells zur Vesikelbildung (**Abb. 1.2**). Die Bindung von Glykoproteinen an Galectin-3-Multimere könnte dabei für eine Membrankrümmung sorgen, welche dann nur noch abgeschnitten werden müsste (Delacour and Jacob, 2006).

Auf diesen Annahmen basierend wurden P75-GFP-Vesikel aufgereinigt und deren Proteinzusammensetzung im MALDI-TOF analysiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nachdem die Vesikel das TGN verlassen hatten änderte sich sowohl die Proteinvielfalt als auch die Proteinzusammensetzung (**Abb. 3.5**). Hauptsächlich handelte es sich dabei um Zytoskelettelemente wie Tubuline, β -Actin und Zytokeratine (**Tab. 3.1**), die offensichtlich im Transport der Vesikel involviert sind. So scheint Actin im *post*-TGN-Transport von P75 involviert zu sein (Lazaro-Diequez et al., 2007). Da das Hauptaugenmerk allerdings auf der Entstehung der Vesikel lag, wurde auf diese Proteine nicht weiter eingegangen. Vielmehr wurde das Interesse auf ein Protein gelenkt, das als ein potentieller Kandidat für die Abschnürung der P75-Vesikel in Frage kam. Dabei handelte es sich um das bisher vor allem unter virologischen Aspekten untersuchte Mx1. Dieses Dynamin-ähnliche Protein gilt in den meisten Organismen als streng INF-induziert (Haller and Kochs, 2002; Haller et al., 2007). MDCK-Zellen synthetisieren recht hohe Mengen an Mx1, wobei dessen Konzentration nach einer Virusinfektion noch gesteigert wird (Nakamura et al., 2005; Seitz et al., 2010). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass Mx1 in MDCK-Zellen möglicherweise eine weitere Aufgabe außerhalb der Interferonantwort haben könnte. Als Dynamin-ähnliche GTPase lag die Vermutung nahe, dass dieses mechanochemische Protein dazu in der Lage war, Membranen zu vesikulieren. Zum Verlassen von P75 aus dem TGN wird Dynamin-2 benötigt (Kreitzer et al., 2000; Salvarezza et al., 2009). Für den Fall des durch Galectin-3 durchgeführten Sortierschrittes im *post*-Golgi-Kompartiment war jedoch nicht bekannt, ob dafür ebenfalls ein Dynamin bzw. ein Dynamin-ähnliches Protein nötig ist.

Als Grundlage für die Fähigkeit eines Proteins, Vesikel aus einer Membran abzuschneiden, gilt die Möglichkeit der Oligomerisierung. Diese Voraussetzung wird von den Mitgliedern der Dynamin-Superfamilie erfüllt, zu denen auch Mx1 gehört (Gao et al., 2010). Das wohl bekannteste Beispiel für die Beteiligung von Dynamin an einer Vesikelbildung ist die Clathrin-abhängige Endozytose. In diesem Zusammenhang wird noch über den tatsächlichen Mechanismus hinter der Abknospung des Vesikels diskutiert. Im Raum steht die Diskussion zur Rolle von Dynamin als *Pinchase* oder *Poppase*. Letzten Endes jedoch führt die Abschnürung des Vesikels auf die GTP-Hydrolyse der einzelnen Dynamin-Moleküle und die damit verbundene Konformationsänderung zurück (Stowell et al., 1999; Sweitzer and Hinshaw, 1998). Im Hinblick auf Oligomerisierung und mechanochemische Eigenschaften durch GTP-Hydrolyse besitzt Mx1 dieselben Eigenschaften wie klassische Dynamine. So konnte gezeigt werden, dass humanes MxA (zur Nomenklatur: das humane Mx1-Homologe wird als MxA bezeichnet) im Transmissions-Elektronenmikroskop sichtbare Homo-Oligomere aus ca. 30 Einzelmolekülen bilden kann, die sehr an Dynaminstrukturen erinnern (Kochs et al., 2002). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass MxA Lipide tubulieren kann. D. h. durch Zugabe von rekombinantem MxA und GTP zu Phosphatidylserin-Liposomen entstehen verzweigte Membrantubuli (Accola et al., 2002). Im Verlauf dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass das GFP-markierte canine Mx1 trotz fehlender PH-Domäne, die von klassischen Dynaminen zur Bindung an Phospholipide genutzt werden, in oder an Membranen zu finden ist (**Abb. 3.9 C**). Diese Kompartimente zeigten in Lebendzellaufnahmen von MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen außerdem eine sehr hohe Dynamik und verschmolzen sehr oft miteinander oder trennten sich wieder (**Abb. 3.9 A + B**). Dies könnte darauf hinweisen, dass Mx1 tatsächlich an der Abknospung von Vesikeln beteiligt ist.

Die Western-Blot-Daten zu den P75-GFP-Vesikelaufreinigungen nach TGN-Exit weisen daraufhin, dass die maximale Menge an Mx1 nach ca. 5 Minuten in den Vesikeln zu finden ist, nachdem diese das TGN verlassen haben (**Abb. 3.6 B**). Hierbei sollte angemerkt werden, dass die 2D-Gel-Daten nicht zu Quantifizierungszwecken genutzt wurden, da die Silber-Färbequalität der einzelnen Gele untereinander natürlich bedingte Unterschiede aufweist und somit über die Proteinmenge keine vergleichbare Aussage getroffen werden kann. Möglicherweise markiert dieser Zeitwert einen Moment im apikalen Sortierprozess zu dem sich Lipid-Raft-assoziierte von nicht mit Lipid-Rafts assoziierten Proteinen voneinander trennen, da ungefähr im gleichen Zeitraum Galectin-3 in die Vesikel gelangt (**Abb. 3.6 A**). Einen weiteren Hinweis darauf gibt die exklusive Anwesenheit von Mx1 in Nicht-Lipid-Raft-Vesikeln mit den assoziierten Proteinen P75-GFP und LPH (**Abb. 3.6 C**). In SI-Vesikeln konnte kein Mx1 nachgewiesen werden. 10 Minuten nach TGN-Exit nimmt die Mx1-Menge in den P75-GFP-Vesikeln wieder ab. Diese werden dann zur apikalen Zytoplasmamembran transportiert.

In der MALDI-TOF-Analyse konnten keine Mantelproteine identifiziert werden. Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, heißt dies allerdings nicht, dass sie auch nicht vorhanden waren. Zusätzliche Western-Blot-Experimente, in denen nach der Anwesenheit von Clathrin, COP I und COP II auf P75-GFP-Vesikeln geschaut wurde, konnten allerdings ebenfalls keine positiven Ergebnisse zeigen (Daten unveröffentlicht). Dies weist darauf hin, dass im *post*-Golgi-Transport von P75-GFP-Vesikeln und den darin stattfindenden Sortierprozessen keine Mantelproteine beteiligt sind, was auch bereits für den Transport von HA aus dem TGN publiziert wurde. Auch dafür sind keine Mantelproteine nötig (Ellis et al., 2004). Durch diese Tatsachen wird die These einer alleine auf der Clusterbildung durch Galectin-3 gestützten initialen Vesikelbildung bekräftigt. Es wäre möglich, dass wie bereits geschildert (**Abb. 1.2**) Galectin-3 mit den Lipid-Raft-unabhängigen Membran-Glykoproteinen wie P75 hochmolekulare Proteincluster bildet, was zu einer Krümmung der Membran eines *post*-TGN-Vesikels führen könnte. Die Abschnürung könnte letzten Endes von Mx1 als Dynamin-ähnliches Protein übernommen werden (**Abb. 4.2**).

Im KLSM konnte eine gemeinsame Lokalisation von Mx1-GFP und P75-DsRed gezeigt werden. Anschließende Co-Immunopräzipitationen konnten allerdings keine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachweisen (**Abb. 3.11**), wovon allerdings auch nicht auszugehen war. Ebenso wenig konnte eine direkte Interaktion mit α -Tubulin nachgewiesen werden. Konfokalmikroskopische Aufnahmen konnten jedoch zeigen, dass Mx1-GFP-Strukturen sehr wohl mit dem Tubulin-Zytoskelett in Kontakt treten und gelegentlich perlschnurartig daran aufgereiht sind. Möglicherweise spielen hier diverse Motorproteine eine Rolle. Eine Bewegung entlang von Mikrotubuli in MDCK_{Mx1-GFP}-Zellen wiederum wurde nicht beobachtet (s. Diplomarbeit Christina Hollmann). In diesem Zusammenhang wurde bereits von Horisberger eine lediglich transiente Interaktion von MxA mit Tubulinen beobachtet (Horisberger, 1992). Mx1 in Schafzellen, die ebenfalls wie MDCK-Zellen eine Interferon-unabhängige Mx1-Expression zeigen, scheint mit β -Tubulin in Interaktion treten zu können (Racicot and Ott, 2010). Im Laufe der KLSM-Aufnahmen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem weitere zelluläre Markerproteine auf Kollaboration mit Mx1-GFP getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die zunächst an Lysosomen erinnernden Mx1-Strukturen nicht mit dem Lysosomenmarker LAMP-2 in Deckung gebracht werden konnten. Eine Übereinstimmung mit ER-DsRed konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (**Abb. 3.12**), während Reichelt et al. in mit LaCrosse-Virus infizierten humanen Huh7-Zellen eine Ansammlung von MxA gemeinsam mit dem N-Protein des Virus am glatten ER festmachen konnten (Reichelt et al., 2004). Vielmehr konnte eine teilweise Übereinstimmung mit dem frühen Endosomen-Marker EEA-1 beobachtet werden (**Abb. 3.12**). Dies lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass Mx1 in einem endosomalen Kompartiment anzutreffen war. Auch die anschließenden TIRF-Aufnahmen von Mx1-GFP gemeinsamen mit diversen endosomalen Markerproteinen lieferten Hinweise auf die Anwesenheit

von Mx1 in frühen Endosomen. Hier zeigte sich eine teilweise Deckung des Mx1-GFP-Signals mit dem frühen Endosomen-Marker Rab4. Dagegen konnte Mx1-GFP nicht in Rab11-positiven Recycling-Endosomen detektiert werden. Auch mit dem TGN-Marker Rab8 zeigte sich keine Colokalisation (**Abb. 3.15**). Diese Ergebnisse und der Inhalt diverser Publikationen führten dazu, die Rolle von Mx1 im Endozytoseweg näher zu betrachten. Also wurde Mx1-GFP gemeinsam mit Clathrin, Dynamin-2 und EEA-1 im KLSM beobachtet. Dabei stellte sich heraus, dass Mx1 nicht mit Clathrin interagiert, wohl aber Bereiche auszumachen waren, in denen Mx1 gemeinsam mit Dynamin-2 und EEA-1 anzutreffen waren (**Abb. 3.13**). Dies legt die Vermutung nahe, dass Mx1 neben seiner Anwesenheit im Vorwärtstransport von P75-GFP-Vesikeln auch eine Rolle im Endozytoseweg einnimmt. Dabei konnte im Gegensatz zu Jatiani *et al.* keine Co-Immunopräzipitation zwischen Mx1 und Dynamin-2 festgestellt werden (Jatiani and Mittal, 2004). Diese Arbeitsgruppe konnte beweisen, dass eine Überexpression von MxA in CHO-Zellen zu einer Störung des Transferrin-Traffickings nach dessen Aufnahme führt. Transferrin akkumuliert daraufhin in einem perinukleären Recycling-Kompartiment. Ein weiteres Beispiel für die Verwicklung von Mx1 im Endozytoseweg lieferten Palm *et al.* Hier konnte genauer gezeigt werden, dass Mx1 in Schweinezellen in den Endozytosemechanismus von Influenza-A-Viren eingreift. Offensichtlich blockiert Mx1 dort das Verschmelzen von frühen mit späten Endosomen (Palm et al., 2010).

Nach den weitestgehend deskriptiven Experimenten zur Aufklärung der Rolle von Mx1 im apikalen Proteintrafficking sollte im Anschluss mit Hilfe der siRNA-Technik aktiv in die von diesem Dynamin-ähnlichen Protein ausgeführten Aufgaben eingegriffen werden. Zunächst sollte an Hand einer Oberflächen-Immunopräzipitation kontrolliert werden, ob Mx1 eine essentielle Rolle im Sortieren bzw. Transport von P75-GFP zur apikalen Zytoplasmamembran besitzt. Nach Mx1-*knock-down* konnte eine um ca. 5 % reduzierte Anwesenheit von P75-GFP auf der Oberfläche der apikalen Zytoplasmamembran festgestellt werden. Diese nur schwache Auswirkung auf den apikalen Transport von P75-GFP lässt auf eine gewisse Redundanz von Mx1 schließen. Möglicherweise werden die von ihm ausgeführten Aufgaben von einem anderen Mitglied der Dynamin-Superfamilie übernommen.

In Schafzellen gemachte Beobachtungen über Mx1 und dessen Sekretion lenkten dann das Augenmerk auf einen anderen zellbiologischen Aspekt. In der Arbeitsgruppe um Ott *et al.* wurde festgestellt, dass Mx1 in Schafzellen trotz fehlender ER-Signalsequenz sekretiert wird (Toyokawa et al., 2007a). Die Autoren schlossen darauf, dass es sich bei der Mx1-Sekretion um einen sogenannten unkonventionellen Sekretionsmechanismus handeln müsse. Daraus erschlossen sich Gemeinsamkeiten mit dem in dieser Dissertation aufgegriffenen Thema zum Galectin-3-Trafficking. Wie bereits erwähnt, war das Schicksal dieses Lektins nach Vollführung seiner Rolle als Sortierrezeptor für nicht Lipid-Raft assoziierte Glykoproteine weitestgehend unbekannt. Untersucht

wurde bereits, dass Galectin-3, genau wie Mx1, ohne ER-Signal auf unkonventionellem Weg sekretiert wird (Nickel, 2003). Und zwar in MDCK-Zellen ins apikale Medium (Lindstedt et al., 1993). Diese Tatsache konnte hier belegt werden (**Abb. 3.20**). Wurde im gleichen Experiment zuvor ein Mx1-*knock-down* durchgeführt, so reduzierte sich die Menge von Galectin-3 im apikalen Medium deutlich. TIRF-Aufnahmen zeigten dann auch eine deutliche Colokalisierung zwischen Mx1-GFP und Galectin-3 dicht unter der apikalen Zytoplasmamembran (**Abb. 3.18**). Offensichtlich scheint also das Galectin-3-Schicksal eng mit dem von Mx1 verflochten zu sein. Eine weitere Publikation von Ott *et al.* postuliert Mx1 als Regulator der unkonventionellen Sekretion (Toyokawa et al., 2007b). Dort wurde bewiesen, dass der *knock-down* von Mx1 in Schafzellen dazu führte, dass das ebenfalls unkonventionell sekretierte ISG15 zu 50 % weniger in das umgebende Medium abgegeben wurde. In einer zusätzlichen Publikation wurde Galectin-1 als Bindepartner von Mx1 im Hefe-2-Hybrid-System identifiziert (Toyokawa et al., 2007a). Im Verlauf dieser Dissertation konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen Mx1 und Galectin-3 gemessen werden (**Abb. 3.19**). In der gleichen Co-Immunopräzipitation wurde jedoch deutlich, dass Mx1-GFP und das endogene Mx1 miteinander interagieren, was darauf hinweist, dass Mx1 in MDCK-Zellen genau wie MxA Oligomere bildet.

4.2.2 Galectin-3-Recycling

Durch die Ergebnisse dieser Dissertation ließ sich also eine Verknüpfung zwischen dem exozytotischen Sortierprozess von Galectin-3 im apikalen Trafficking nicht Lipid-Raft assoziierter Proteine mit der unkonventionellen Sekretion finden. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die unkonventionelle Sekretion des Lectins von Mx1 abhängt, welches wiederum in P75-GFP-Vesikeln identifiziert wurde. Wird die Mx1-Expression per siRNA-Behandlung herabgesetzt, so findet nur noch eine eingeschränkte Galectin-3-Sekretion statt.

In diesem Diskussionsabschnitt soll das weitere Schicksal des in der apikalen Sortierung von P75 involvierten Lektins näher beleuchtet werden. Wie bereits erwähnt, stellt sich die Frage nach dem Schicksal von Galectin-3, nachdem dieses für die Sortierung apikaler Glykoproteine wie P75-GFP gesorgt hat. Zunächst wurde versucht, die Galectin-3-Exozytose auf der Oberfläche von MDCK-Zellen festzuhalten, wie dies in COS-Zellen bereits beschrieben wurde. Hier zeigten sich im TIRF-Mikroskop in der Form Exozytoseereignisse, dass aus dem Zytoplasma kommende Galectin-3-Vesikel an die Zytoplasmamembran andockten und in dieser verschmolzen (Schneider et al., 2010). Ähnliche Exozytoseereignisse im TIRF-Mikroskop wurden von Burchfield *et al.* in einem Übersichtartikel beschrieben (Burchfield et al., 2010). In MDCK-Zellen konnten allerdings in Lebendzellaufnahmen keine Fusionsereignisse von Galectin-3 mit der apikalen Zytoplasmamembran beobachtet werden.

Vermutlich macht dies die unebene und sehr dynamische Oberfläche, die mit Mikrovilli besetzt ist, nicht möglich. Sehr wohl konnte jedoch eine Colokalisierung von P75-GFP und Galectin-3-DsRed auf und dicht unterhalb der apikalen Zytoplasmamembran präsentiert werden (**Abb. 3.21**). Dabei wurden teils längliche, röhrenförmige und teils runde Strukturen sichtbar, deren Identität zunächst geklärt werden musste. Weitere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass es sich bei den länglichen Strukturen teilweise um Rab11-positive Kompartimente, also Recycling-Endosomen handelt. Sowohl P75-GFP als auch Galectin-3-DsRed konnten mit diesen Rab11-positiven Strukturen in Verbindung gebracht werden (**Abb. 3.21**). Diese Beobachtungen erwiesen sich zunächst als verwirrend, da endosomale Kompartimente bislang nur selten als tubuläre Strukturen aufgezeichnet wurden. Zudem sollte in Betracht gezogen werden, dass die apikale Oberfläche von MDCK-Zellen mit langen, röhrenförmigen Mikrovilli besetzt ist. Also wurden zusätzlich Aufnahmen der apikalen Oberfläche von MDCK_{P75-GFP}-Zellen im Transmissions-Elektronenmikroskop gemacht. Dabei wurde deutlich, dass die mit P75-GFP besetzten fingerförmigen Strukturen sehr an Mikrovilli erinnerten. Dies legt die Interpretation nahe, dass es sich bei den tubulären Strukturen an der apikalen Seite der MDCK-Zellen zum einen um Mikrovilli handelt und zum anderen um röhrenförmig verzweigte Recycling-Endosomen. Um diesem Sachverhalt näher auf die Spur zu gehen, wurden TIRF-Aufnahmen von MDCK_{P75-GFP}-Zellen gemacht, in denen zusätzlich Zytoskelettelemente angefärbt wurden. Diese Aufnahmen legen nochmals nahe, dass es sich zumindest teilweise um Mikrovilli handelt, da viele der länglichen Strukturen eine Actin-Färbung aufweisen (**Abb. 3.24**). Letzten Endes sollte ein weiterer Versuch Aufschluss über die Identität der im TIRF abgebildeten Strukturen geben. Hierfür wurden MDCK_{P75-GFP}- oder MDCK_{Gal3-DsRed}-Zellen mit Antikörpern gegen das jeweils transfizierte Protein gefärbt, ohne die Zellen zuvor zu permeabilisieren. Folglich wurden so von den Antikörpern ausschließlich Antigene auf der Oberfläche der Zellen detektiert, nicht aber im Zellinneren. Hier zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zwischen den fluoreszierenden Signalen auf der Oberfläche und denen in der Zelle. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei den intrazellulären Strukturen um Endosomen und nicht um Mikrovilli handelt.

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass der Versuch, eine Galectin-3-Exozytose im Mikroskop zu beobachten leider nicht gelungen ist. Gleichzeitig wurden allerdings durch den Einsatz der TIRFM bisher nie gesehene Aufnahmen des apikalen Zellpols von MDCK-Zellen gemacht. Bei diesen tubulären Strukturen handelt es sich sehr wahrscheinlich zum Teil um Mikrovilli und zu einem anderen Teil um Recycling-Endosomen (**Abb. 4.2**). Deutlich war aber auch, dass Galectin-3 die Zelle an der apikalen Seite verlässt. So stellte sich also die Frage, ob es auch wieder in die Zelle aufgenommen wurde. Dies sollte anhand diverser Experimente erörtert werden.

Zunächst wurde auf biochemischem Wege gezeigt, dass von außen zugegebenes, rekombinantes Galectin-3 in MDCK-Zellen aufgenommen wird. Der eigentliche Anspruch hinter diesem Experiment

war jedoch herauszufinden, auf welchem Endozytoseweg Galectin-3 in die Zelle aufgenommen wird. Deshalb wurden während der Aufnahme entsprechende Endozytosehemmer hinzugegeben. Filipin verhindert durch seine Interaktion mit Cholesterol die Endozytose in Lipid-Raft-Strukturen, während Chlorpromazin die Clathrin-abhängige Endozytose inhibiert (Ivanov, 2008). Durch diesen Versuchsaufbau wurde deutlich, dass weniger rekombinantes Galectin-3 in die Zellen aufgenommen wurde, wenn die Aufnahme über Lipid-Rafts geblockt wurde (**Abb. 3.26**). Diese Beobachtung war zunächst verwirrend, da die Exozytose von Galectin-3 bekannter Weise in Nicht-Lipid-Raft-Domänen abläuft (Delacour et al., 2006). Gleichzeitig führt dies allerdings zur Kernaussage dieses Abschnitts der Dissertation: Offensichtlich verändert Galectin-3 im Verlaufe seines Recyclings über die apikale Zytoplasmamembran seine Assoziation mit bestimmten Membranmikrodomänen. Während es im sekretorischen Weg in Nicht-Lipid-Raft-Strukturen anzutreffen ist, sprich in P75- und LPH-Vesikeln, scheint seine Wiederaufnahme von der Zelloberfläche in Caveolae, also Lipid-Raft-Strukturen abzulaufen. Diese Hypothese wurde in einem weiteren Experiment untermauert. Wieder wurde rekombinantes Galectin-3 auf MDCK-Zellen gegeben, die mit unterschiedlichen Fusionsproteinen transfiziert wurden. Zum einen waren dies die Lipid-Raft-Marker Caveolin und Flotillin und zum anderen Clathrin. Im Folgenden wurde die Aufnahme von in diesem Fall Galectin-3-A633 in diese Zellen im TIRFM betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass der Großteil des Lectins über Caveolin- bzw. Flotillin-positive Strukturen aufgenommen wurde, während nahezu keine Clathrin-abhängige Endozytose stattfand (**Abb. 3.27**). Das gleiche Phänomen konnte in Brustkrebszellen beobachtet werden (Furtak et al., 2001). Im Falle von Galectin-1 wird dieses sowohl Clathrin als auch Lipid-Raft-abhängig endozytiert (Fajka-Boja et al., 2008). Ebenso wie die Galectin-1-Endozytose ist die Galectin-3-Endozytose von der Lektinaktivität abhängig. Gibt man Lactose als kompetitiven Inhibitor in das umgebende Medium, so wird Galectin-3 nicht mehr in die Zelle aufgenommen (Schneider et al., 2010). Im Gegensatz zu Galectin-3 ist bekannt, dass Galectin-1 an das in Lipid-Rafts vorkommende Sphingolipid GM1 bindet.

Dabei ist zu diskutieren, warum und auf welche Weise Galectin-3 seine Präferenz für gewisse Membrandomänen ändert. Sein Verwandter Galectin-4 bindet mit hoher Affinität an Lipid-Raft-Glykolipide (Delacour et al., 2005). Ob Galectin-3 ebenfalls dazu in der Lage ist, ist bisher nicht bekannt. Weitere Untersuchungen sollen dazu Aufschluss geben. Bisher wurden lediglich Interaktionen mit Glykoproteinen wie P75 und GP114 nachgewiesen. Des Weiteren stellen sich generelle Fragen nach der Regulation der Galectin-3-Funktion. Was passiert z. B. mit dem Lektin, nachdem es mit Glykoproteinen des Lipid-Raft-unabhängigen Transportweges hochmolekulare Proteincluster gebildet hat? Wie lange bleibt diese Interaktion bestehen und wodurch wird sie wieder aufgehoben? Eine Möglichkeit der Regulation besteht im proteolytischen Abbau von Galectin-3 durch Matrix-Metalloproteasen wie MMP7. Diese Zink-abhängige Endopeptidase ist dazu in der

Lage, Galectin-3 in drei Fragmente zu schneiden (Puthenedam et al., 2011). So könnten z. B. die hochmolekularen Proteincluster aufgelöst werden. Allerdings wäre dann ein Galectin-3-Recycling obsolet. In diesem Kontext stellt sich die Frage, wie viel des sekretierten Galectin-3 überhaupt wieder aufgenommen wird. Dazu gibt es bisher noch keine Daten. Außerdem stellt sich die Frage nach einem Rezeptor auf der Zelloberfläche. Für Galectin-9 ist dies das Lipid-Raft-assoziierte Forssmann-Glykosphingolipid (Mishra et al., 2010). Jedenfalls scheint es für Galectin-3 ein Glykolipid oder Glykoprotein zu sein, da, wie bereits erwähnt, die Aufnahme von Galectin-3 in die Zelle durch die Zugabe von Lactose inhibierbar ist. Diese Tatsache schränkt die Auswahl eines Galectin-3-Rezeptors auf der Zelloberfläche auf ein Lipid-Raft-assoziiertes Glykoprotein oder Glykolipid ein. Fakt ist, dass von außen zugegebenes Galectin-3 über einen Lipid-Raft-abhängigen Endozytosemechanismus in die Zelle aufgenommen wird. Der weitere Weg folgt über vermutlich frühe Endosomen in Rab11-markierte Recycling-Endosomen (Schneider et al., 2010). In dieser Hinsicht ist von großem Interesse, ob Galectin-3 an diesem Punkt wieder in den sekretorischen Weg eingeschleust wird und dann seine Sortierfunktion übernimmt oder den lysosomalen Weg einschlägt und abgebaut wird. Dieser Fragestellung soll zeitnah durch eine Kombination aus TGN-Exit- und Endozytose-Experimenten nachgegangen werden.

Bevor nun wieder auf die Regulationsmöglichkeiten der Galectin-3-Funktion eingegangen wird, sollte zunächst erwähnt werden, dass nicht alle von Galectin-3 eingegangenen Interaktionen von dessen Fähigkeit, Kohlenhydrate zu binden, abhängt. So konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 in einer Kohlenhydrat-unabhängigen Weise an Chrp (cystein/histidin rich protein) (Menon et al., 2000) oder auch an β -Catenin bindet, da dieses nicht glykosyliert ist (Shimura et al., 2004).

β -Catenin stellt wiederum eine gute Überleitung zur Galectin-3-Regulation dar, da, wie bereits erwähnt, Galectin-3 im Zellkern mit β -Catenin interagiert und dort phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung dient dann als Zellkern-Exportsignal. Eine weitere Folge der Phosphorylierung kann die Herabsetzung der Bindekapazität von Galectin-3 an diverse Liganden sein. Mazurek *et al.* postulieren die Galectin-3-Phosphorylierung als An/Aus-Schalter für dessen Kohlenhydrat-Bindekapazität (Mazurek et al., 2000). Dies würde eine weitere Möglichkeit darstellen, wie die Bindung zwischen Galectin-3 und den von ihm sortierten Glykoproteinen wieder aufgehoben werden kann. Möglicherweise wird aber die Interaktion zwischen dem Lektin und seinen Liganden auch gar nicht gelöst, bis diese die apikale Zytoplasmamembran erreichen. Es wäre durchaus denkbar, dass Galectin-3 sozusagen „huckepack“ mit den Glykoproteinen in das umgebende Medium entlassen wird oder auch zunächst gebunden bleibt. Galectin-1 z. B. bindet nach seiner Sekretion direkt an Glykoproteine auf der Zelloberfläche (Fajka-Boja et al., 2008). Oft dienen Galectine für das Verbleiben von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, indem sie diese vernetzen und dadurch deren Endozytose verhindern (Garner and Baum, 2008).

Für die Endozytose müsste Galectin-3 dann wieder seinen Liganden wechseln, da die Aufnahme wie gezeigt (**Abb. 3.27**), in Lipid-Raft-Strukturen abläuft. Als möglicher Schalter für diesen Wechsel der Membranmikrodomänen kommt der umgebende pH-Wert in Frage. Neben der Phosphorylierung bestimmt auch der pH-Wert die Galectin-3-Bindekapazität an seine Liganden. Bisher unveröffentlichte Daten zeigen, dass die Auswahl an Proteinen, die an Galectin-3 binden, mit dem pH-Wert schwankt. Möglicherweise erfolgt durch einen pH-Wertwechsel eine bestimmte Konformationsänderung innerhalb des Galectin-3-Moleküls, die einen Einfluss auf die CRD und somit auf die Kohlenhydrat-Bindekapazität haben.

An dieser Stelle sollte nicht unerwähnt bleiben, dass der Neurotrophinrezeptor P75 in MDCK-Zellen zwar als klassisches nicht mit Lipid-Rafts assoziiertes Protein gilt, in einigen neuronalen Zellen und in PC12-Zellen aber durchaus in solchen DRMs zu finden ist. Diese Assoziation scheint vom Phosphorylierungszustand von P75 abzuhängen (Higuchi et al., 2003). Außerdem kann der Neurotrophinrezeptor sowohl Clathrin-abhängig, als auch Clathrin-unabhängig endozytiert werden (Bronfman et al., 2003; Deinhardt et al., 2007). In MDCK-Zellen findet jedoch nur eine sehr schwache P75-Endozytose statt (Le et al., 1991). Nichtsdestotrotz wäre ein Szenario denkbar, dass Galectin-3 gemeinsam mit seinem Liganden P75 aus dem sekretorischen Weg an der Zelloberfläche von MDCK-Zellen ankommt, diese dort ihre Präferenz für Lipid-Rafts wechseln und deshalb über Caveolae endozytiert werden.

Im letzten Abschnitt des Ergebnisteils wurde sich den Beobachtungen zum Proteintransport im Primärzilium von MDCK-Zellen gewidmet. Bei dem Versuch der Betrachtung von Exozytoseereignissen auf der apikalen Oberfläche polarer MDCK-Zellen wurden nach einer Immunfluoreszenzfärbung gegen α -Tubulin sehr lange Ziliensstrukturen sichtbar, bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Primärzilien handelt. Diese waren nur einmal pro Zelle zu entdecken und je nach Alter der Zellen im Durchschnitt zwischen 2,7 μm und 5,2 μm lang (**Abb. 3.29**). Innerhalb dieser Strukturen konnte in MDCK_{P75-GFP/Gal3-DsRed}-Zellen ein vesikulärer Transport entdeckt werden. Diese beide Protein-Marker enthaltenden Vesikel bewegten sich entweder ungerichtet hin und her (**Abb. 3.31 A**) oder durchwanderten das Zilium vom einen zum anderen Ende (**Abb. 3.31 B**). Koch *et al.* konnten bereits die essentielle Rolle von Galectin-3 in der Ziliogenese beschreiben. Galectin-3-Knockout-Zellen zeigten eine ungewöhnliche Verlängerung der primären Zilien (Koch et al., 2010; Torkko et al., 2008). Im Kontext dieser Dissertation könnte die Frage gestellt werden, ob dieser Transport innerhalb des primären Ziliums vielleicht der Sekretion von Galectin-3 dienen könnte. Leider konnte auch hier kein direkter Beweis gefunden werden. Wie bereits geschildert, konnte zwar ein Transport, aber keine Exozytose im Bild festgehalten werden. Dabei stellt sich natürlich die Frage nach dem Sinn dieses Transportprozesses. Das Primärzilium dient möglicherweise der Detektion von

Flüssigkeitsströmungen. Unter Umständen ist Galectin-3 auch am Sortierprozess der dafür notwendigen Sensorproteine in die Membran des Primärziliums beteiligt.

Festzuhalten bleibt, dass Galectin-3 im primären Zilium in vesikulären Strukturen anwesend ist und mit diesen transportiert wird. Um diesen interessanten Sachverhalt genauer aufzuklären, müssen weitere Experimente folgen.

4.3 Galectin-3 und die Entstehung klarzelliger Nierenzellkarzinome

In seiner Eigenschaft als Kohlenhydrat-bindendes Protein kommen für Galectin-3 eine Vielfalt von Interaktionen mit Glykoproteinen oder Glykolipiden in Frage. Zahlreiche dieser Wechselwirkungen haben einen Einfluss auf den Zellzyklus, die Tumorgenese oder die Metastasierung. Genauer gesagt wurde die Involvierung von Galectin-3 in der Zell-Adhäsion, der Zellmigration, im Zellzyklus, der Angiogenese und als antiapoptotischer Faktor nachgewiesen (Eude-Le, I et al., 2009). Allerdings gibt es nach wie vor einen erhöhten Diskussionsbedarf zur genauen Rolle von Galectin-3 in diesen Prozessen. Gegensätzliche Aussagen zum Galectin-3-Expressionslevel in verschiedenen Tumorarten geben Anlass zu diversen Interpretationen. So steigt die Galectin-3-Expression in Lymphomen, Hals- und Nackentumoren, Schilddrüsen-, Leber- und Magentumoren, während sie in Brust-, Gebärmutter- und Prostatakarzinomen sinkt. Die Galectin-3-Knockout-Maus zeigt keine Tendenz zur Entwicklung spontaner Tumoren, besitzt aber Entwicklungsstörungen im Bereich der Knochen, der Niere und des Darmes (Delacour et al., 2008). Außerdem zeigt sie immunologische Störungen. Zusätzlich zum Expressionslevel scheint auch die intrazelluläre Lokalisierung von Galectin-3 mit dem Entartungszustand einer Zelle zu korrelieren. Trotz fehlendem NLS (Nuclear Localization Signal) kann Galectin-3 in den Zellkern eindringen. Im Kern wird das Lektin von CK1 phosphoryliert und kehrt durch diese als Exportsignal dienende Modifikation wieder ins Zytoplasma zurück. Derselbe Shuttlemechanismus wird vom Galectin-3-Bindepartner β -Catenin genutzt. Beide Proteine interagieren im Zellkern miteinander und sorgen gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor Tcf für die Erhöhung der Transkription der Gene für den positiven Zellzyklusregulator Cyclin D1 und das Proto-Onkogen C-Myc (Shimura et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass im Falle des Prostata-Karzinoms die herabgesetzte Anwesenheit von Galectin-3 im Zellkern mit der Tumorprogression korrelierte (van den Brule et al., 2000). Offensichtlich wird hier die Expressionsregulation von Cyclin D1 und C-Myc nicht mehr gewährleistet.

Im Fall der in dieser Dissertation beschriebenen Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom wurde zum einen auf das Expressionsniveau von Galectin-3 fokussiert und zum anderen ein Beweis erbracht, dass in klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine verstärkte Interaktion zwischen Galectin-3 und β -Catenin festzustellen ist. Die Western-Blot-Analyse des Galectin-3-Proteinlevels von 16 Patienten, deren Niere wegen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms entfernt wurde, zeigte, dass im Tumorgewebe die Galectin-3-Menge stark ansteigt (**Abb. 3.33**). Im Vergleich dazu bleiben die Werte für α -Tubulin und GAPDH weitestgehend konstant. Darüber hinaus konnte anhand einer Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass sich im Tumorgewebe eine gesteigerte Interaktion zwischen Galectin-3 und β -Catenin ausbildet, die im Normalgewebe unterhalb der Messgrenze liegt und im Übergang schwächer ausgeprägt ist (**Abb. 3.32**).

Diese Ergebnisse lassen einige Spekulationen zur Rolle von Galectin-3 bei der Entstehung klarzelliger Nierenzellkarzinome zu. Zunächst ist dieser Tumortyp in die Reihe der Typen einzuordnen, bei denen sich die Galectin-3-Expression ebenfalls erhöht zeigt. Je nach Zelltyp scheint entweder die erhöhte oder die erniedrigte Expression von Galectin-3 in der Entstehung von Tumoren involviert zu sein. Interessanterweise konnten Merseburger *et al.* durch die Quantifizierung histologischer Schnitte aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigen, dass die Tumoraggressivität negativ mit der Galectin-3-Expression korrelierte. D. h. die Überlebensrate der Patienten stieg mit einer erhöhten Galectin-3-Expression an (Merseburger *et al.*, 2008). Demzufolge schließen Merseburger *et al.* darauf, dass Galectin-3 eher eine Tumor-suppressive Wirkung hat. Möglicherweise aber verändert Galectin-3 auch seine Rolle im Laufe der Tumorentwicklung. Dazu wäre allerdings eine detailliertere Analyse der genauen Tumoreinstufungen (Grading) nötig, die im Zuge dieses kleinen Teilprojektes der Dissertation nicht möglich war. Zum jetzigen Zeitpunkt lassen sich die gesammelten Daten in der Weise interpretieren, dass eine gesteigerte Expression von Galectin-3 möglicherweise zu einer verstärkten Interaktion mit β -Catenin außerhalb des Zellkerns führt und diese somit nicht mehr in den Zellkern transportiert werden, um dort eine Zellzyklus-regulierende Aufgabe wahrzunehmen. Um dies herauszufinden, wäre es nötig, Zellkerne aus Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen aufzureinigen und dort nach Co-Immunopräzipitationen zwischen Galectin-3 und β -Catenin zu sehen, um dies mit zytoplasmatischen Aufreinigungen zu vergleichen. Dabei könnte man ebenfalls den Phosphorylierungsstatus von Galectin-3 überprüfen, da dieser mit dem metastatischen Potential von Darmkrebszellen in Verbindung steht (Mazurek *et al.*, 2000).

Nicht außer acht gelassen werden sollte außerdem die Rolle von β -Catenin bei der Zell-Zell-Adhäsion über *Aherens-Junctions*. Hier stellt β -Catenin einen Baustein dar, der diese Zell-Zell-Verknüpfungen an das Actin-Zytoskelett bindet. Störungen in diesem Gefüge durch die Interaktion mit Galectin-3 könnten zu einem gesteigerten Ablösen der Tumorzellen und damit zu einer Metastasierung führen (Goetz *et al.*, 2008). Eine äußerst interessante Verknüpfung in der Tumorbilogie zwischen Mx1 und Galectin-3 lieferten Mushinski *et al.* Sie konnten feststellen, dass in stark metastasierenden Krebszellen (PC-3M) im Gegensatz zu schwach metastasierenden Krebszellen (PC-3) eine niedrigere Mx1-Konzentration herrscht (Mushinski *et al.*, 2009). Somit scheint Mx1 die Tumormobilität und Invasivität zu inhibieren. Man könnte daraus schließen, dass Mx1 das in den Krebszellen stark exprimierte Galectin-3 durch seine potentielle Rolle als Regulator der unkonventionellen Galectin-3-Sekretion aus der Zelle ausschleust und somit die Interaktion mit β -Catenin verhindert.

Die über die Zeit gemachten Erfahrungen zu Untersuchungen der Rolle von Galectin-3 in der Tumorgenese führten dazu, auf Galectin-3 basierende Antitumorstrategien zu testen. So setzten John *et al.* erfolgreich eine am N-Terminus verkürzte rekombinante Galectin-3-Version ein, um das Wachstum und die Metastasierung von Brustkrebszellen in Nacktmäusen zu unterbinden (John *et al.*,

2003). Ebenso konnte ein an die CRD von Galectin-3 bindendes Peptid die Metastasierung und Zell-Adhäsion von Brustkrebszellen verhindern (Zou et al., 2005).

Über die Rolle von Galectin-3 bei der Metastasierung der in dieser Arbeit untersuchten Patienten kann in diesem Zusammenhang keine Aussage getroffen werden, da dieser Aspekt zum einen nicht im Vordergrund stand und zum anderen das weitere Schicksal der Patienten nicht in diese Studie mit einbezogen wurde.

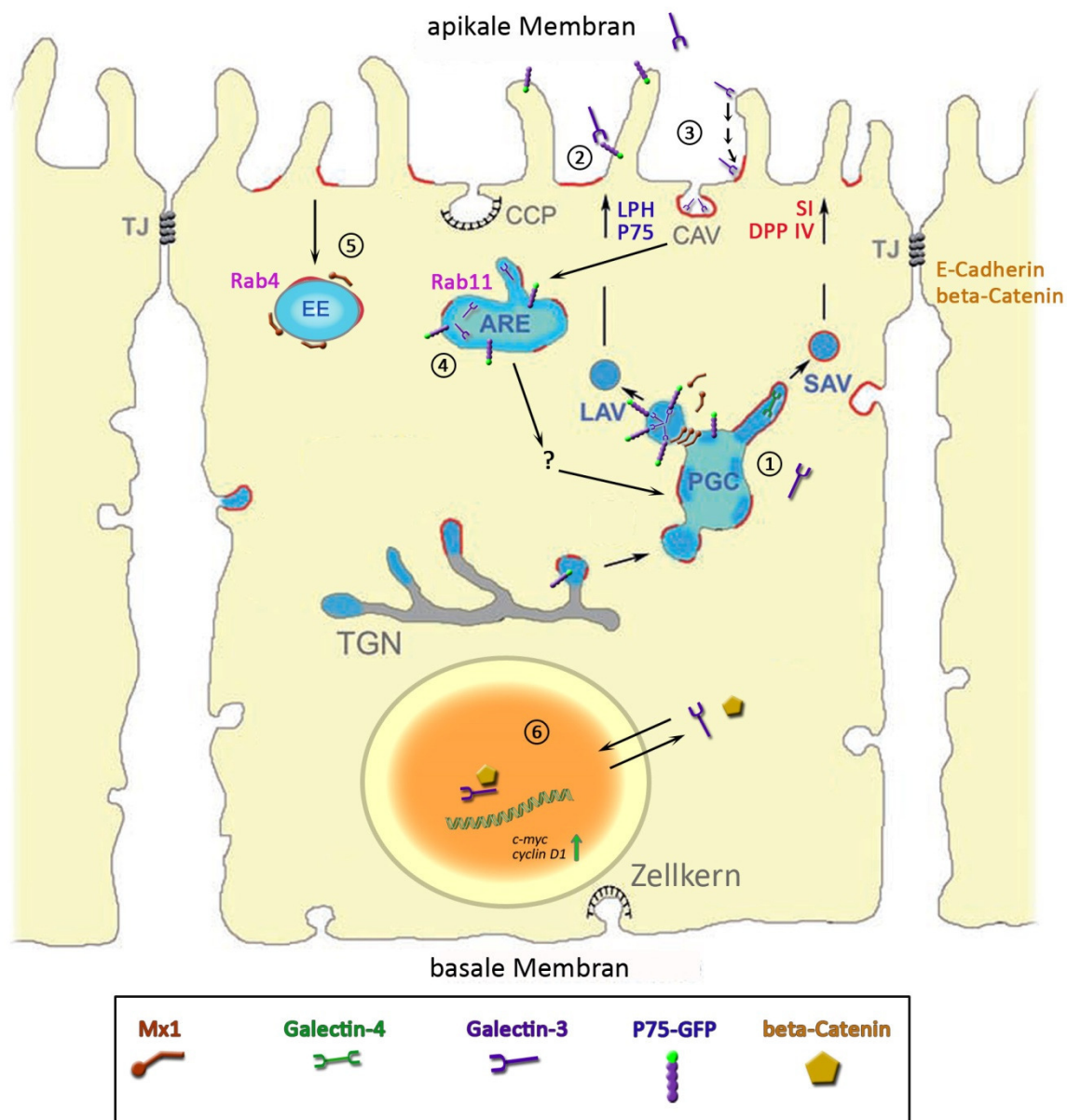


Abbildung 4.2: Modell zur Rolle von Galectin-3 und Mx1 in polaren Epithelzellen

1) Galectin-3 gelangt ca. 10 min nach dem TGN-Exit von P75-GFP in ein *post*-Golgi-Kompartiment. Dort bindet es an P75-O-Glykane und sorgt so für die Sortierung dieses Lipid-Raft-unabhängigen Proteins. Kurze Zeit vorher erreicht Mx1 ebenfalls dieses Kompartiment und hilft dort möglicherweise später bei der Abschnürung der LAVs. 2) Galectin-3 wird am apikalen Zellpol sekretiert. Auf welche Weise wurde noch nicht endgültig bewiesen. Es könnte sein, dass es gemeinsam mit seinem Liganden P75-GFP aus der Zelle gelangt. Der *knock-down* von Mx1 sorgt für eine reduzierte Galectin-3-Sekretion. 3) Interessanterweise wechselt Galectin-3 nach seiner Sekretion aus dem Nicht-Lipid-Raft-Milieu in diese DRMs und wird über Caveolae endozytiert. 4) P75-GFP liegt gemeinsam mit seinem Sortierrezeptor Galectin-3 u. a. in einem teils tubulären subapikalen Recycling-Kompartiment vor, welches als Transitstation für die Rückführung von Galectin-3 in den sekretorischen Weg dienen könnte. 5) Mx1 taucht nicht nur in sekretorischen Vesikeln auf, sondern auch in frühen Endosomen. Eventuell ist es gemeinsam mit Dynamin-2 am Abschnüren von Endozytosevesikeln beteiligt. 6) Galectin-3 befindet sich genau wie β -Catenin in einem Phosphorylierungs-abhängigen Shuttling-Prozess zwischen Zytoplasma und Zellkern. Im Zellkern kommt es zur Interaktion der beiden, was zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors TCF führt, der wiederum für die verstärkte Expression des Protoonkogens c-myc und des Zellzyklus-Regulators cyclin D1 sorgt. Darin liegt ein potentielles Risiko zur Entstehung klarzelliger Nierenzellkarzinome verborgen. ARE: apikales Recycling-Endosom, EE: *Early Endosom*, CAV: Caveolae, CCP: *Clathrin coated pit*, DPP IV: Dipeptidyl Peptidase IV, LAV: LPH assoziierte Vesikel, LPH: Lactase-Phlorizin-Hydrolase, SAV: SI assoziierte Vesikel, SI: Saccharase-Isomaltase, TJ: *Tight Junction*, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk (abgeändert nach Delacour und Jacob, 2006).

5 Zusammenfassung

Polare Epithelzellen stellen einen essentiellen Baustein für die korrekte Funktion eines Organes dar. Sie bilden ein Monolayer an den Organaußengrenzen aus und stellen sowohl eine Barriere gegen, als auch ein Austauschsystem mit der Umwelt dar. Um diese speziellen Aufgaben wahrzunehmen, bedarf es einer geordneten und spezialisierten Aufteilung der Zytoplasmamembran. Die apikale Zytoplasmamembran ist dabei zur Außenwelt orientiert, während die basolaterale Zytoplasmamembran an benachbarte Zellen oder die Basallamina angrenzt. Für die Aufrechterhaltung dieser Polarität ist ein spezielles Protein- und Lipidsortiersystem nötig. Dabei sind bis dato zwei Grundlegende Proteinsortierplattformen bekannt. Zum einen handelt es sich um die Lipid-Raft-assoziierte Sortierung, bei der sich Proteine mit Vorliebe für solche Detergens-resistenten Membranmikrodomänen in diesen sammeln und als hochmolekulare Cluster zur Oberfläche transportiert werden. Zum anderen existiert ein Sortierweg, der auf der Bindung von Galectin-3 an die zu sortierenden Glykoproteine basiert. Auch in diesem Lipid-Raft-unabhängigen Weg bilden die beteiligten Proteine hochmolekulare Cluster.

Zunächst wurde die Rolle der Alpkinese ALPK1 im Transport apikaler Proteine im Mäusedarm untersucht und eine Verwicklung in den Transport der Lipid-Raft-Proteine SI und DPP IV festgestellt. Im Hauptteil dieser Dissertation ging es um die Erweiterung des Verständnisses des Lipid-Raft-unabhängigen Proteinsortierweges. Insbesondere wurde festgestellt, dass für das vesikuläre *post*-TGN-Trafficking im Galectin-3-Sorting vermutlich keine Mantelproteine nötig sind, wohl aber ein Dynamamin-ähnliches Protein involviert ist. Dabei handelt es sich um die große GTPase Mx1. Der *knock-down* dieses Proteins führte zu einer leicht reduzierten Transporteffizienz des von Galectin-3 sortierten Glykoproteins P75-GFP zur apikalen Zytoplasmamembran. Des Weiteren konnte durch Mx1 eine Verbindung zur unkonventionellen Sekretion von Galectin-3 gefunden werden. Durch siRNA-Experimente gegen Mx1 wurde festgestellt, dass dadurch die Sekretion von Galectin-3 abnahm. Interessanterweise scheint sekretiertes Galectin-3 für seine Wiederaufnahme in die Zelle eine Präferenz für Lipid-Rafts zu entwickeln, da gezeigt werden konnte, dass die Galectin-Endozytose in DRMs abläuft und durch einen Inhibitor der Lipid-Raft-abhängigen Endozytose gehemmt werden kann.

Unter Zuhilfenahme der TIRF-Mikroskopie konnte die Oberfläche von MDCK-Zellen in bisher nicht gekannter Detailtreue abgebildet werden. Dabei konnten sowohl Mikrovilli, als auch dicht unter der apikalen Oberfläche befindliche Recycling-Endosomen detektiert werden, die möglicherweise als Sortierstation von Galectin-3 und P75-GFP dienen.

Neben den Aufgaben von Galectin-3 bei der Epithelzellpolarisierung scheint dieses Lektin außerdem auch bei der Ausbildung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine Rolle zu spielen. In einem Teilprojekt konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 dort ein erhöhtes Expressionslevel aufweist und verstärkt mit β -Catenin interagiert.

Zusammengefasst legen die in dieser Dissertation vorgelegten Studien nahe, dass das vielseitige und in der Entwicklung klarzelliger Nierenzellkarzinome beteiligte Protein Galectin-3 während seines Lebenszyklus, zu dem die Sortierung apikaler nicht mit Lipid-Rafts assoziierter Glykoproteine gehört, eine alternierende Präferenz für diese Detergens-resistenten Membranen aufzeigt und seine unkonventionelle Sekretion offensichtlich mit der Dynamin-ähnlichen GTPase Mx1 in Verbindung steht.

5 Summary

Polar epithelial cells are the prerequisite for a functional organ. They build a monolayer on the outer surface of the organ, providing both a barrier and an exchange system to the surrounding environment. To fulfill these requirements they have developed a special partitioning of their plasma membrane, where the apical part faces the exterior and the basolateral part faces the neighboring cells or the basal lamina. To keep this polarity, epithelial cells possess both a lipid and protein sorting system, which follow two known sorting platforms. There is a lipid raft associated pathway, where lipid raft proteins gather in these detergent resistant membranes to build high molecular weight clusters, which are then transported to the apical cell surface. In addition there is a lectin based pathway, where galectin-3 binds to non-raft glycoproteins to also form high molecular weight clusters.

Initially the role of ALPK1, an alphakinase, was analyzed in the mouse small intestinal tract, where an involvement in the transport of the lipid-raft proteins SI and DPP IV was discovered.

The main project dealt with the characterization of the non-raft apical sorting pathway. It was revealed that there were no coat proteins involved in this galectin-3 dependent post golgi trafficking, however a GTPase named Mx1 was discovered to be present. When Mx1 was knocked down the transport efficiency of P75-GFP, which is sorted by galectin-3, was reduced. Furthermore it seems like Mx1 is implicated in unconventional galectin-3 secretion. In Mx1 knock down cells the lectin was secreted to a much lesser extent and interestingly galectin-3 reuptake is dependent on the integrity of lipid-rafts as shown by the biochemical and microscopic data.

With the help of TIRF microscopy it was possible to reveal previously unknown details of the apical MDCK cell surface. Microvilli were observed, recycling endosomes close to the apical plasma membrane, which are thought to be sorting stations for galectin-3 and P75-GFP were also seen.

Besides its role in cell polarization galectin-3 seems to be involved in the development of clear cell renal cell carcinoma. Here the lectin is expressed at a higher level and shown to interact with β -catenin.

In summary the data shown in this dissertation suggests that galectin-3, which is involved in the development of clear cell renal cell carcinoma and the apical sorting of non-raft proteins, has an alternating preference for detergent resistant membranes during its life cycle and that its unconventional secretion is dependent on the GTPase Mx1.

6 Literaturverzeichnis

- Accola, M.A., Huang, B., Al, M.A., McNiven, M.A., 2002. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 277, pp. 21829-21835.
- Alfalalah, M., Jacob, R., Naim, H.Y., 2002. Intestinal dipeptidyl peptidase IV is efficiently sorted to the apical membrane through the concerted action of N- and O-glycans as well as association with lipid microdomains. *J.Biol.Chem.* 277, pp. 10683-10690.
- Alfalalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K.P., Naim, H., Naim, H.Y., 1999. O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr.Biol.* 9, pp. 593-596.
- AMBION, 2006. RNA Interference Research Guide. In: pp. 3-8.
- Ang, A.L., Folsch, H., Koivisto, U.M., Pypaert, M., Mellman, I., 2003. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J.Cell Biol.* 163, pp. 339-350.
- Aridor, M., Hannan, L.A., 2000. Traffic jam: a compendium of human diseases that affect intracellular transport processes. *Traffic.* 1, pp. 836-851.
- Aridor, M., Hannan, L.A., 2002. Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic.* 3, pp. 781-790.
- Astanina, K., Jacob, R., 2010. KIF5C, a kinesin motor involved in apical trafficking of MDCK cells. *Cell Mol.Life Sci.* 67, pp. 1331-1342.
- Balan, V., Nangia-Makker, P., Jang, Y.S., Wang, Y., Raz, A., 2010. Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase. *Biochim.Biophys.Acta.*
- Brandli, A.W., Parton, R.G., Simons, K., 1990. Transcytosis in MDCK cells: identification of glycoproteins transported bidirectionally between both plasma membrane domains. *J.Cell Biol.* 111, pp. 2909-2921.
- Breuza, L., Garcia, M., Delgrossi, M.H., Le, B.A., 2002. Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp.Cell Res.* 273, pp. 178-186.
- Bronfman, F.C., Tcherpakov, M., Jovin, T.M., Fainzilber, M., 2003. Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J.Neurosci.* 23, pp. 3209-3220.
- Burchfield, J.G., Lopez, J.A., Mele, K., Vallotton, P., Hughes, W.E., 2010. Exocytotic vesicle behaviour assessed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Traffic.* 11, pp. 429-439.
- Cai, H., Reinisch, K., Ferro-Novick, S., 2007. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev.Cell* 12, pp. 671-682.

- Chmelar, R.S., Nathanson, N.M., 2006. Identification of a novel apical sorting motif and mechanism of targeting of the M2 muscarinic acetylcholine receptor. *J.Biol.Chem.* 281, pp. 35381-35396.
- Clark, K., Langeslag, M., van, L.B., Ran, L., Ryazanov, A.G., Figdor, C.G., Moolenaar, W.H., Jalink, K., van Leeuwen, F.N., 2006. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J.* 25, pp. 290-301.
- Cooper, D.N., Barondes, S.H., 1990. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J.Cell Biol.* 110, pp. 1681-1691.
- Cramm-Behrens, C.I., Dienst, M., Jacob, R., 2008. Apical cargo traverses endosomal compartments on the passage to the cell surface. *Traffic.* 9, pp. 2206-2220.
- Cresawn, K.O., Potter, B.A., Oztan, A., Guerriero, C.J., Ihrke, G., Goldenring, J.R., Apodaca, G., Weisz, O.A., 2007. Differential involvement of endocytic compartments in the biosynthetic traffic of apical proteins. *EMBO J.* 26, pp. 3737-3748.
- Cullen, P.J., 2008. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9, pp. 574-582.
- Davezac, N., Tondelier, D., Lipecka, J., Fanen, P., Demaugre, F., Debski, J., Dadlez, M., Schratzenholz, A., Cahill, M.A., Edelman, A., 2004. Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane. *Proteomics.* 4, pp. 3833-3844.
- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R., Rodriguez-Boulan, E., 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* 452, pp. 719-723.
- Deinhardt, K., Reversi, A., Berninghausen, O., Hopkins, C.R., Schiavo, G., 2007. Neurotrophins Redirect p75NTR from a clathrin-independent to a clathrin-dependent endocytic pathway coupled to axonal transport. *Traffic.* 8, pp. 1736-1749.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le, B.A., Naim, H.Y., Jacob, R., 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr.Biol.* 16, pp. 408-414.
- Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J.P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., Andre, S., Le, B.A., Gabius, H.J., Manninen, A., Simons, K., Huet, G., 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J.Cell Biol.* 169, pp. 491-501.
- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le, B.A., Jacob, R., 2007. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic.* 8, pp. 379-388.
- Delacour, D., Jacob, R., 2006. Apical protein transport. *Cell Mol.Life Sci.* 63, pp. 2491-2505.
- Delacour, D., Koch, A., Ackermann, W., Eude-Le, P., I, Elsasser, H.P., Poirier, F., Jacob, R., 2008. Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo. *J.Cell Sci.* 121, pp. 458-465.
- Delacour, D., Koch, A., Jacob, R., 2009. The role of galectins in protein trafficking. *Traffic.* 10, pp. 1405-1413.
- Dumic, J., Dabelic, S., Fogel, M., 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim.Biophys.Acta* 1760, pp. 616-635.

- Ellis, M.A., Miedel, M.T., Guerriero, C.J., Weisz, O.A., 2004. ADP-ribosylation factor 1-independent protein sorting and export from the trans-Golgi network. *J.Biol.Chem.* 279, pp. 52735-52743.
- Eude-Le, P., I, Gendronneau, G., Dang, T., Delacour, D., Thijssen, V.L., Edelmann, W., Peuchmaur, M., Poirier, F., 2009. Genetic assessment of the importance of galectin-3 in cancer initiation, progression, and dissemination in mice. *Glycobiology* 19, pp. 68-75.
- Fajka-Boja, R., Blasko, A., Kovacs-Solyom, F., Szebeni, G.J., Toth, G.K., Monostori, E., 2008. Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell Mol.Life Sci.* 65, pp. 2586-2593.
- Folsch, H., Mattila, P.E., Weisz, O.A., 2009. Taking the scenic route: biosynthetic traffic to the plasma membrane in polarized epithelial cells. *Traffic.* 10, pp. 972-981.
- Furtak, V., Hatcher, F., Ochieng, J., 2001. Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 289, pp. 845-850.
- Gao, S., von der, M.A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G., Daumke, O., 2010. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465, pp. 502-506.
- Garner, O.B., Baum, L.G., 2008. Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem.Soc.Trans.* 36, pp. 1472-1477.
- Gibson, A., Futter, C.E., Maxwell, S., Allchin, E.H., Shipman, M., Kraehenbuhl, J.P., Domingo, D., Odorizzi, G., Trowbridge, I.S., Hopkins, C.R., 1998. Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic pathway of polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* 143, pp. 81-94.
- Glebov, O.O., Bright, N.A., Nichols, B.J., 2006. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat.Cell Biol.* 8, pp. 46-54.
- Glinsky, V.V., Glinsky, G.V., Rittenhouse-Olson, K., Huflejt, M.E., Glinskii, O.V., Deutscher, S.L., Quinn, T.P., 2001. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res.* 61, pp. 4851-4857.
- Goetz, J.G., Joshi, B., Lajoie, P., Strugnell, S.S., Scudamore, T., Kojic, L.D., Nabi, I.R., 2008. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J.Cell Biol.* 180, pp. 1261-1275.
- Gonzalez, A., Rodriguez-Boulan, E., 2009. Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett.* 583, pp. 3784-3795.
- Gravotta, D., Deora, A., Perret, E., Oyanadel, C., Soza, A., Schreiner, R., Gonzalez, A., Rodriguez-Boulan, E., 2007. AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, pp. 1564-1569.
- Habjan, M., Penski, N., Wagner, V., Spiegel, M., Overby, A.K., Kochs, G., Huiskonen, J.T., Weber, F., 2009. Efficient production of Rift Valley fever virus-like particles: The antiviral protein MxA can inhibit primary transcription of bunyaviruses. *Virology* 385, pp. 400-408.
- Haller, O., Kochs, G., 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* 3, pp. 710-717.

- Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G., 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89, pp. 812-818.
- Hansen, C.G., Nichols, B.J., 2009. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J.Cell Sci.* 122, pp. 1713-1721.
- Hatae, T., Ichimura, T., Ishida, T., Sakurai, T., 1997. Apical tubular network in the rat kidney proximal tubule cells studied by thick-section and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 288, pp. 317-325.
- Heine, M., Cramm-Behrens, C.I., Ansari, A., Chu, H.P., Ryazanov, A.G., Naim, H.Y., Jacob, R., 2005. Alpha-kinase 1, a new component in apical protein transport. *J.Biol.Chem.* 280, pp. 25637-25643.
- Higuchi, H., Yamashita, T., Yoshikawa, H., Tohyama, M., 2003. PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J.* 22, pp. 1790-1800.
- Hoekstra, D., Tyteca, D., van Ijzendoorn, S.C., 2004. The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development. *J.Cell Sci.* 117, pp. 2183-2192.
- Horio, M., Chin, K.V., Currier, S.J., Goldenberg, S., Williams, C., Pastan, I., Gottesman, M.M., Handler, J., 1989. Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby canine kidney cell epithelia. *J.Biol.Chem.* 264, pp. 14880-14884.
- Horisberger, M.A., 1992. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J.Virol.* 66, pp. 4705-4709.
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., Mellman, I., 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66, pp. 907-920.
- Imoto, M., Tachibana, I., Urrutia, R., 1998. Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *J.Cell Sci.* 111 (Pt 10), pp. 1341-1349.
- Inohara, H., Raz, A., 1995. Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer Res.* 55, pp. 3267-3271.
- Ivanov, A.I., 2008. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol.Biol.* 440, pp. 15-33.
- Jacob, R., Alfalah, M., Grunberg, J., Obendorf, M., Naim, H.Y., 2000. Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J.Biol.Chem.* 275, pp. 6566-6572.
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., Naim, H.Y., 2003. Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr.Biol.* 13, pp. 607-612.
- Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K.P., Rescher, U., Gerke, V., Naim, H.Y., 2004. Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 279, pp. 3680-3684.
- Jacob, R., Naim, H.Y., 2001. Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr.Biol.* 11, pp. 1444-1450.

- Jatiani, S.S., Mittal, R., 2004. Expression of the antiviral protein MxA in cells transiently perturbs endocytosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 323, pp. 541-546.
- Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G., 2007. Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev.Cell* 13, pp. 511-522.
- John, C.M., Leffler, H., Kahl-Knutsson, B., Svensson, I., Jarvis, G.A., 2003. Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 9, pp. 2374-2383.
- Kang, E.H., Moon, K.C., Lee, E.Y., Lee, Y.J., Lee, E.B., Ahn, C., Song, Y.W., 2009. Renal expression of galectin-3 in systemic lupus erythematosus patients with nephritis. *Lupus* 18, pp. 22-28.
- Koch, A., Poirier, F., Jacob, R., Delacour, D., 2010. Galectin-3, a novel centrosome-associated protein, required for epithelial morphogenesis. *Mol.Biol.Cell* 21, pp. 219-231.
- Kochs, G., Haener, M., Aebi, U., Haller, O., 2002. Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J.Biol.Chem.* 277, pp. 14172-14176.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., Rodriguez-Boulán, E., 2000. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat.Cell Biol.* 2, pp. 125-127.
- Kreitzer, G., Schmoranz, J., Low, S.H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., Simon, S.M., Rodriguez-Boulán, E., 2003. Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat.Cell Biol.* 5, pp. 126-136.
- Kundu, A., Avalos, R.T., Sanderson, C.M., Nayak, D.P., 1996. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J.Virol.* 70, pp. 6508-6515.
- Ladinsky, M.S., Wu, C.C., McIntosh, S., McIntosh, J.R., Howell, K.E., 2002. Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments. *Mol.Biol.Cell* 13, pp. 2810-2825.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, pp. 680-685.
- Laiko, M., Murtazina, R., Malyukova, I., Zhu, C., Boedeker, E.C., Gutsal, O., O'Malley, R., Cole, R.N., Tarr, P.I., Murray, K.F., Kane, A., Donowitz, M., Kovbasnjuk, O., 2010. Shiga toxin 1 interaction with enterocytes causes apical protein mistargeting through the depletion of intracellular galectin-3. *Exp.Cell Res.* 316, pp. 657-666.
- Lazaro-Diequez, F., Colonna, C., Cortegano, M., Calvo, M., Martinez, S.E., Egea, G., 2007. Variable actin dynamics requirement for the exit of different cargo from the trans-Golgi network. *FEBS Lett.* 581, pp. 3875-3881.
- Le Bivic, A., Sambuy, Y., Patzak, A., Patil, N., Chao, M., Rodriguez-Boulán, E., 1991. An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J.Cell Biol.* 115, pp. 607-618.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S.H., Mostov, K.E., Leffler, H., 1993. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J.Biol.Chem.* 268, pp. 11750-11757.

- Liu, F.T., Rabinovich, G.A., 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat.Rev.Cancer* 5, pp. 29-41.
- MADIN, S.H., ANDRIESE, P.C., DARBY, N.B., 1957. The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals. *Am.J.Vet.Res.* 18, pp. 932-941.
- Massa, S.M., Cooper, D.N., Leffler, H., Barondes, S.H., 1993. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry* 32, pp. 260-267.
- Matter, K., Hunziker, W., Mellman, I., 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 71, pp. 741-753.
- Mazurek, N., Conklin, J., Byrd, J.C., Raz, A., Bresalier, R.S., 2000. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J.Biol.Chem.* 275, pp. 36311-36315.
- Mehul, B., Hughes, R.C., 1997. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J.Cell Sci.* 110 (Pt 10), pp. 1169-1178.
- Mellman, I., Nelson, W.J., 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9, pp. 833-845.
- Menon, R.P., Strom, M., Hughes, R.C., 2000. Interaction of a novel cysteine and histidine-rich cytoplasmic protein with galectin-3 in a carbohydrate-independent manner. *FEBS Lett.* 470, pp. 227-231.
- Merseburger, A.S., Kramer, M.W., Hennenlotter, J., Serth, J., Kruck, S., Gracia, A., Stenzl, A., Kuczyk, M.A., 2008. Loss of galectin-3 expression correlates with clear cell renal carcinoma progression and reduced survival. *World J.Urol.* 26, pp. 637-642.
- Mishra, R., Grzybek, M., Niki, T., Hirashima, M., Simons, K., 2010. Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107, pp. 17633-17638.
- Mushinski, J.F., Nguyen, P., Stevens, L.M., Khanna, C., Lee, S., Chung, E.J., Lee, M.J., Kim, Y.S., Linehan, W.M., Horisberger, M.A., Trepel, J.B., 2009. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. *J.Biol.Chem.* 284, pp. 15206-15214.
- Nakamura, T., Asano, A., Okano, S., Ko, J.H., Kon, Y., Watanabe, T., Agui, T., 2005. Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J.Interferon Cytokine Res.* 25, pp. 169-173.
- Nickel, W., 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur.J.Biochem.* 270, pp. 2109-2119.
- Nickel, W., 2005. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* 6, pp. 607-614.
- Nieminen, J., St-Pierre, C., Sato, S., 2005. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J.Leukoc.Biol.* 78, pp. 1127-1135.

- Nykjaer, A., Willnow, T.E., Petersen, C.M., 2005. p75NTR--live or let die. *Curr.Opin.Neurobiol.* 15, pp. 49-57.
- Paladino, S., Pocard, T., Catino, M.A., Zurzolo, C., 2006. GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* 172, pp. 1023-1034.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., Zurzolo, C., 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J.Cell Biol.* 167, pp. 699-709.
- Palm, M., Garigliany, M.M., Cornet, F., Desmecht, D., 2010. Interferon-induced Sus scrofa Mx1 blocks endocytic traffic of incoming influenza A virus particles. *Vet.Res.* 41, p. 29.
- Patnaik, S.K., Potvin, B., Carlsson, S., Sturm, D., Leffler, H., Stanley, P., 2006. Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 16, pp. 305-317.
- Pocard, T., Le, B.A., Galli, T., Zurzolo, C., 2007. Distinct v-SNAREs regulate direct and indirect apical delivery in polarized epithelial cells. *J.Cell Sci.* 120, pp. 3309-3320.
- Poland, P.A., Rondanino, C., Kinlough, C.L., Heimbürg-Molinaro, J., Arthur, C.M., Stowell, S.R., Smith, D.F., Hughey, R.P., 2010. Identification and characterization of endogenous galectins expressed in Madin Darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.*
- Praefcke, G.J., McMahon, H.T., 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5, pp. 133-147.
- Puthenedam, M., Wu, F., Shetye, A., Michaels, A., Rhee, K.J., Kwon, J.H., 2011. Matrilysin-1 (MMP7) cleaves galectin-3 and inhibits wound healing in intestinal epithelial cells. *Inflamm.Bowel.Dis.* 17, pp. 260-267.
- Racicot, K., Ott, T., 2010. The Myxovirus Resistance Protein, MX1, Interacts with Tubulin Beta In Uterine Glandular Epithelial Cells. *Am.J.Reprod.Immunol.*
- Reichelt, M., Stertz, S., Krijnse-Locker, J., Haller, O., Kochs, G., 2004. Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic.* 5, pp. 772-784.
- Rini, J.M., Lobsanov, Y.D., 1999. New animal lectin structures. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 9, pp. 578-584.
- Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G., Musch, A., 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6, pp. 233-247.
- Rothman, J.H., Raymond, C.K., Gilbert, T., O'Hara, P.J., Stevens, T.H., 1990. A putative GTP binding protein homologous to interferon-inducible Mx proteins performs an essential function in yeast protein sorting. *Cell* 61, pp. 1063-1074.
- Ryazanov, A.G., Pavur, K.S., Dorovkov, M.V., 1999. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr.Biol.* 9, p. R43-R45.
- Salvareza, S.B., Deborde, S., Schreiner, R., Campagne, F., Kessels, M.M., Qualmann, B., Caceres, A., Kreitzer, G., Rodriguez-Boulán, E., 2009. LIM kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans-Golgi network. *Mol.Biol.Cell* 20, pp. 438-451.

- Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R., Harada, A., 2007. The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* 448, pp. 366-369.
- Schneider, D., Greb, C., Koch, A., Straube, T., Elli, A., Delacour, D., Jacob, R., 2010. Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur.J.Cell Biol.*
- Schuck, S., Simons, K., 2004. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J.Cell Sci.* 117, pp. 5955-5964.
- Seitz, C., Frensing, T., Hoper, D., Kochs, G., Reichl, U., 2010. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J.Gen.Virol.* 91, pp. 1754-1763.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H., Raz, A., 2005. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* 65, pp. 3535-3537.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A., Raz, A., 2004. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 64, pp. 6363-6367.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, pp. 569-572.
- Slimane, T.A., Lenoir, C., Bello, V., Delaunay, J.L., Goding, J.W., Chwetzoff, S., Maurice, M., Fransen, J.A., Trugnan, G., 2001. The cytoplasmic/transmembrane domain of dipeptidyl peptidase IV, a type II glycoprotein, contains an apical targeting signal that does not specifically interact with lipid rafts. *Exp.Cell Res.* 270, pp. 45-55.
- Stowell, M.H., Marks, B., Wigge, P., McMahon, H.T., 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat.Cell Biol.* 1, pp. 27-32.
- Sweitzer, S.M., Hinshaw, J.E., 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, pp. 1021-1029.
- Tajika, Y., Matsuzaki, T., Suzuki, T., Aoki, T., Hagiwara, H., Kuwahara, M., Sasaki, S., Takata, K., 2004. Aquaporin-2 is retrieved to the apical storage compartment via early endosomes and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 145, pp. 4375-4383.
- Takata, K., Matsuzaki, T., Tajika, Y., Ablimit, A., Hasegawa, T., 2008. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem.Cell Biol.* 130, pp. 197-209.
- Takenaka, Y., Fukumori, T., Raz, A., 2004. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj.J.* 19, pp. 543-549.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., Amigorena, S., 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J.Immunol.* 166, pp. 7309-7318.
- Thery, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat.Rev.Immunol.* 2, pp. 569-579.
- Thompson, A., Nessler, R., Wisco, D., Anderson, E., Winckler, B., Sheff, D., 2007. Recycling endosomes of polarized epithelial cells actively sort apical and basolateral cargos into separate subdomains. *Mol.Biol.Cell* 18, pp. 2687-2697.

- Torkko, J.M., Manninen, A., Schuck, S., Simons, K., 2008. Depletion of apical transport proteins perturbs epithelial cyst formation and ciliogenesis. *J.Cell Sci.* 121, pp. 1193-1203.
- Toyokawa, K., Carling, S.J., Ott, T.L., 2007a. Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): I. Ovine Mx1 is secreted by endometrial epithelial cells via an 'unconventional' secretory pathway. *Am.J.Reprod.Immunol.* 57, pp. 13-22.
- Toyokawa, K., Leite, F., Ott, T.L., 2007b. Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): II. The oMx1 protein is a regulator of secretion in an ovine glandular epithelial cell line. *Am.J.Reprod.Immunol.* 57, pp. 23-33.
- Traub, L.M., 2005. Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim.Biophys.Acta* 1744, pp. 415-437.
- Vagin, O., Kraut, J.A., Sachs, G., 2009. Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 296, p. F459-F469.
- van den Brule, F.A., Waltregny, D., Liu, F.T., Castronovo, V., 2000. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int.J.Cancer* 89, pp. 361-367.
- van der Blik, A.M., 1999. Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol.* 9, pp. 96-102.
- van Meer G., Stelzer, E.H., Wijnaendts-van-Resandt, R.W., Simons, K., 1987. Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J.Cell Biol.* 105, pp. 1623-1635.
- van Meer.G., Sprong, H., 2004. Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr.Opin.Cell Biol.* 16, pp. 373-378.
- Verkade, P., Harder, T., Lafont, F., Simons, K., 2000. Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J.Cell Biol.* 148, pp. 727-739.
- Weisz, O.A., Rodriguez-Boulán, E., 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J.Cell Sci.* 122, pp. 4253-4266.
- Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., Liu, F.T., 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert.Rev.Mol.Med.* 10, p. e17.
- Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le, B.A., Rodriguez-Boulán, E., 1997. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* 139, pp. 929-940.
- Yoon, Y., Pitts, K.R., McNiven, M.A., 2001. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol.Biol.Cell* 12, pp. 2894-2905.
- Zou, J., Glinsky, V.V., Landon, L.A., Matthews, L., Deutscher, S.L., 2005. Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion. *Carcinogenesis* 26, pp. 309-318.

7 Anhang

7.1 Lebenslauf und Publikationen

Name: Christoph Patrick Greb

Geburtsdatum: 09.05.1981

Geburtsort: Lauterbach (Hessen)

Schulbildung:

1987 – 1991 Mittelpunk-Grundschule Engelrod

1991 – 2000 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Lauterbach

Universitäre Ausbildung:

2001 – 2006 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg

Hauptfächer: Zellbiologie, Parasitologie, Virologie (Fachbereich Biologie)

2006 Abschluss als Diplom-Biologe

Titel der Arbeit: „Einfluss von Galectin-3 auf die Oligomerisierung apikaler Membranproteine“

Durchgeführt im Institut für Zytobiologie und Zytopathologie in der AG Ralf Jacob

2006 – 2010 Durchführung der praktischen Arbeiten zur Dissertation am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie in der AG Ralf Jacob

Auslandaufenthalte:

2006 Laborbesuch des Kooperationspartners Prof. Alexey G. Ryazanov, Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, New Jersey, USA ermöglicht durch einen Projektbezogenen Personenaustausch des DAAD

2008 Laborbesuch des Kooperationspartners Prof. Alexey G. Ryazanov, Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, New Jersey, USA zur Präparation der ALPK1-Knockout-Mäuse. Ermöglicht durch einen Projektbezogenen Personenaustausch des DAAD

Publikationen:

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Schneider, D., Greb, C., Koch, A., Straube, T., Elli, A., Delacour, D., Jacob, R., 2010. Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur.J.Cell Biol.* 89(11):788-98

Greb, C., Straube, T., von Mach, T., Jacob, R., Shuttling of Galectin-3 between Lipid-Raft dependent exocytic and Lipid-Raft independent endocytic pathways (in preparation)

Elli, A. F., Straube, T., Greb, C., Hegele, A., Elsässer, H.P., Delacour, D., Jacob, R., 2011. Expression and subcellular localization of Galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma (in preparation)

Greb, C., Jacob, R., 2011. Fluoreszenzmikroskopie der apikalen Membran polarer Epithelzellen – TIRF-Mikroskopie auf den Kopf gestellt. *BIOspektrum* (in press)

Weitere Publikationen:

Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A., Jacob, R. (2007) Apical Sorting by Galectin-3-Dependent Glycoprotein Clustering. *Traffic*, pp. 379-388.

Poster:

Greb, C., Hess, M., Koch, A., Cramm-Behrens, C., Delacour, D., Jacob, R.: Identification of Vesicle Components in Apical Protein Transport, SFB 593, Marburg, 2006

Schneider, D., Greb, C., Koch, A., Straube, T., Elli, A. F., Delacour, D., Jacob, R.: Shuttling of Galectin-3 between Lipid-Raft-Dependent Endocytic and Lipid-Raft-Independent Exocytic Traffic, International Symposium of the SFB 593, Marburg, 2009

Schneider, D., Greb, C., Koch, A., Straube, T., Elli, A. F., Delacour, D., Jacob, R.: Shuttling of Galectin-3 between Lipid-Raft-Dependent Endocytic and Lipid-Raft-Independent Exocytic Traffic. 49th Annual Meeting of the ASCB, San Diego, CA, 2009

Vorträge:

Vortrag zum Anlass des „1st International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease“ in Hamburg. Titel des Vortrages: „Shuttling of galectin-3 between Lipid-Raft-dependent and -independent transport pathways“, Hamburg, 2010

7.2 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Uwe Maier für die freundliche Übernahme der Rolle des Erstgutachters dieser Arbeit. Außerdem Prof. Ralf Jacob für die Übernahme des Zweitgutachtens und die engagierte Betreuung während der praktischen Arbeiten sowie die fruchtbaren Diskussionen daneben.

Desweiteren möchte ich allen Labormitgliedern der AG Jacob danken, die stets für ein freundliches und angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Allen voran Waltraud Ackermann und Martina Dienst, die jeden Tag für einen reibungslosen Arbeitsablauf sorgten. Catharina Cramm-Behrens und Ksenia Astanina danke ich für die kulinarischen Leckerbissen. Mathias Eilbracht und Patrick Wenzel haben während ihrer Zeit als Medizindoktoranden immer für gute Stimmung gesorgt und gelegentliche zynische Seitenhiebe tapfer ertragen. Außerdem vielen Dank an Anett Koch, Alexandra Elli und Sabrina Zink.

Dominik Schneider und Tamara Straube bin ich für das aufmerksame Korrekturlesen der Dissertation zu Dank verpflichtet. Außerdem haben wir in unserer gemeinsamen Zeit am Institut die eine oder andere lustige Reise mit unvergesslichen Ereignissen erlebt („Äh, your car is moving...!“). Genau wie Tobias von Mach, der das Potential zum „Ersatz-Holger“ hat. Weiter so!

Meiner Diplomandin Christina Hollmann möchte ich für ihre engagierte Mitarbeit zum Mx1-Thema und ihre zuweilen ausgedehnten Redeausschübe danken. Während dieser Zeit habe ich gelernt, zuzuhören und geduldig zu sein ;-)

Paul Miller Smith und Holger Webert gegenüber sollte ich mich eigentlich nicht für die samstäglichen Kopfschmerzen zu Dank verpflichtet fühlen, die sich zu Beginn und dann auch wieder zum Schluss der Arbeitsphase einstellten. Manchmal auch mittendrin... In diesem Zusammenhang danke ich Alex Sheftel, der mir die Einsicht verschaffte, dass es um weitaus mehr, als nur um Pils geht. Ich danke Euch!

Danke auch an die zum Institutsinventar gehörenden Gisi und Volkwin sowie Rössli für unsere Kaffeepausen mit hochkompetenten Bundesliga-Analysen.

Thomas Anastasiades ist mir während meiner gesamten Zeit in Marburg als treuer Freund, Feuerwehrmann und Seelsorger in allen Lebenslagen nie von der Seite gewichen. Danke für diese außerordentliche Freundschaft! Außerdem weiß ich jetzt, dass Sand auf Zypern verdammt heiß werden kann...

An dieser Stelle möchte ich es nicht verpassen, mich bei allen aktuellen und ehemaligen WG-Mitgliedern Daniel Hussain, Steffen Rausch, Sebastian Porsch und Jens Wilfert für die vergangenen Jahre zu bedanken. Wir hatten eine sehr schöne gemeinsame Zeit. Eine Ära geht zu Ende!

Zuletzt möchte ich meinen Dank und Respekt an die wichtigsten Menschen in meinem Leben aussprechen. Das sind meine Geschwister Stefanie und Caroline nebst Anhang und meine Eltern Harald und Christa mit Oma Erna, die mich in allen Lebenssituationen bedingungslos unterstützt und mir stets als Rückhalt gedient haben. Ich danke euch für die Dinge, die allzu oft als selbstverständlich angesehen werden. Dies ist durch nichts zu ersetzen!

7.3 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

„Proteinkomponenten und Transportwege an der apikalen Membran polarer Epithelzellen“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 16.02.2011

Christoph Greb